

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA**  
**FACOLTÀ DI FARMACIA**



**DIPARTIMENTO DI FARMACIA**  
**Corso di Laurea Specialistica in Farmacia**

**SINTESI DI SOLFONAMMIDI BENZOTIOPIRANOPIRIMIDINICHE QUALI  
POTENZIALI INIBITORI DELL'α- ANIDRASI CARBONICA**

**Relatori:**

Dott.ssa Silvia Salerno

Prof.ssa Sabrina Taliani

Dott.ssa Elisabetta Barresi

**Candidato** Iacopo Malasoma

Anno Accademico 2014-2015



# Indice

<b>Parte Generale</b>	<b>1</b>
1 Introduzione	2
2 Meccanismo catalitico delle anidrasi carboniche e loro inibizione	5
2.1 $\alpha$ - CAs	6
3 Utilizzo clinico generale degli inibitori dell'anidrasi carbonica	10
3.1 Inibitori dell'anidrasi carbonica per il trattamento del glaucoma	17
3.2 Inibitori dell'anidrasi carbonica utilizzati come potenziali farmaci antitumorali	22
3.3 Inibitori dell'anidrasi carbonica utilizzati nella diagnosi del cancro	28
3.4 Inibitori dell'anidrasi carbonica utilizzati come diuretici	28
3.5 Inibitori dell'anidrasi carbonica utilizzati nel trattamento dell'osteoporosi	31
3.6 Inibitori dell'anidrasi carbonica utilizzati come potenziali farmaci antiobesità	32
 <b>Introduzione alla Parte Sperimentale</b>	 <b>35</b>
 <b>Parte Sperimentale</b>	 <b>52</b>
 <b>Bibliografia</b>	 <b>60</b>
 <b>Ringraziamenti</b>	 <b>75</b>

# *Parte Generale*

## 1 INTRODUZIONE

Le ANIDRASI CARBONICHE (CAs) sono una superfamiglia di metalloenzimi (zinco-enzimi) che catalizzano l'interconversione tra anidride carbonica e ione bicarbonato. Hanno una distribuzione ubiquitaria e si ritrovano sia a livello dei procarioti sia degli eucarioti. Sono codificate da cinque distinte famiglie genetiche di diversa evoluzione:

- $\alpha$ -CAs: presenti nei vertebrati, nei batteri, nelle alghe e nel citoplasma delle piante verdi
- $\beta$ -CAs: presenti principalmente nei batteri, nelle alghe e nei cloroplasti sia delle mono- che delle di-cotiledoni.
- $\gamma$ -CAs: presenti soprattutto negli archeobatteri e in altri tipi di batteri.
- $\delta$ -CAs: presenti in qualche diatomea marina.
- $\zeta$ -CAs: presenti in qualche diatomea marina.

Nei vertebrati più sviluppati, compresi gli esseri umani, sono stati scoperti quattordici differenti isoenzimi delle  $\alpha$ -CA, i quali sono stati numerati da I a XIV. Recentemente, un ulteriore enzima CA (CA XV) è stato evidenziato in numerose specie animali, eccetto che negli esseri umani e negli scimpanzé.

Gli isoenzimi delle anidrasi carboniche si distinguono in base alla diversa distribuzione tissutale e subcellulare o in base alla modulazione dell'attività catalitica (idratazione della  $\text{CO}_2$ ), dovuta alle differenze strutturali presenti nel loro sito attivo (tabella 1) <sup>[1,2]</sup>. Le CAs sono:

- citosoliche (isoenzimi I, II, III, VII, XIII)
- mitocondriali (isoenzimi VA, VB)
- legate alla membrana (isoenzimi IV, IX, XII, XIV, XV)
- secrete nella saliva (isoenzima VI).

Sono stati individuati altri isoenzimi nel citosol, noti come CARPs (proteine legate all'anidrasi carbonica) che non sono dotati di attività catalitica poiché non sono presenti residui di istidina, necessari per legare lo ione zinco.

**Tabella1:** isoenzimi  $\alpha$ -CA nei vertebrati superiori

<b>Isoenzima</b>	<b>Attività catalitica idratazione CO<sub>2</sub></b>	<b>Affinità per le solfonammidi</b>	<b>Localizzazione subcellulare</b>
<b>CA I</b>	Moderata	Media	Citosol
<b>CA II</b>	Alta	Molto alta	Citosol
<b>CA III</b>	Molto bassa	Molto bassa	Citosol
<b>CA IV</b>	Alta	Alta	Legato alla membrana
<b>CA VA</b>	Bassa-Moderata	Alta	Mitocondrio
<b>CA VB</b>	Alta	Alta	Mitocondrio
<b>CA VI</b>	Moderata	Alta	Secreto nella saliva/latte
<b>CA VII</b>	Alta	Molto alta	Citosol
<b>CARP VIII</b>	Acatolitica	Sconosciuta	Citosol
<b>CA IX</b>	Moderata-Alta	Alta	Transmembrana
<b>CARP X</b>	Acatolitica	Sconosciuta	Secreto
<b>CARP XI</b>	Acatolitica	Sconosciuta	Secreto
<b>CA XII</b>	Bassa	Molto alta	Transmembrana
<b>CA XIII</b>	Moderata	Medio-Alta	Citosol
<b>CA XIV</b>	Moderata	Alta	Transmembrana
<b>CA XV</b>	Bassa	Sconosciuta	Legato alla membrana

Le CAs catalizzano l'interconversione tra anidride carbonica e ione bicarbonato:



In assenza di catalizzatore la reazione è lenta in condizioni fisiologiche, ma diventa molto veloce in presenza dell'enzima. Le CAs sono quindi coinvolte in processi fisiologici connessi alla respirazione e al trasporto di CO<sub>2</sub>/bicarbonato attraverso i tessuti di metabolizzazione e i polmoni. Esse, inoltre, regolano il pH e l'omeostasi della CO<sub>2</sub>, la secrezione di elettroliti in una varietà di tessuti e organi, le reazioni di biosintesi (come la gluconeogenesi, la lipogenesi e l'urogenesi), il riassorbimento osseo e la calcificazione. Alcuni recenti esperimenti, hanno dimostrato che le CAs sono probabilmente anche coinvolte in alcuni processi patologici (tumorigenecità, obesità, epilessia) <sup>[2,3]</sup>.

Oltre alle reazioni fisiologiche, come l'idratazione reversibile della CO<sub>2</sub> a bicarbonato (reazione 1.1, figura 1) le α-CAs catalizzano altre reazioni:

- L'idratazione del cianato ad acido carbammico, o della cianammide ad urea (reazioni 1.2 e 1.3)
- L'idratazione dell'aldeide a gem-diolo (reazione 1.4)
- L'idrolisi dell'estere carbossilico o solfonico (reazioni 1.5 e 1.6) e altri processi idrolitici minori, come quelli descritti dalle reazioni 1.7-1.9 in Figura 1 <sup>[3]</sup>

$O=C=O + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+$	1.1
$O=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCOOH$	1.2
$HN=C=NH + H_2O \leftrightarrow H_2NCONH_2$	1.3
$RCHO + H_2O \leftrightarrow RCH(OH)_2$	1.4
$RCOOAr + H_2O \leftrightarrow RCOOH + ArOH$	1.5
$RSO_3Ar + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + ArOH$	1.6
$ArF + H_2O \leftrightarrow HF + ArOH$	1.7
(Ar = 2,4-dinitrophenyl)	
$PhCH_2OCOC(=O)Cl + H_2O \leftrightarrow PhCH_2OH + CO_2 + HCl$	1.8
$RSO_2Cl + H_2O \leftrightarrow RSO_3H + HCl$	1.9
(R=Me;Ph )	

**Figura1.** Reazioni catalizzate dalla α-CAs.

L'attività fosfatase, precedentemente descritta dalla CA III, è stata recentemente provata essere un artefatto <sup>[1]</sup>.

Non è ancora ben chiaro se altre reazioni catalizzate dalla α-CA, come l'idratazione della CO<sub>2</sub>, abbiano o meno un significato fisiologico.

E' stata determinata la struttura cristallografica a raggi X per sei  $\alpha$ -CAs (isoenzimi CA I-VA, CAXII e CA XIV) <sup>[1,4]</sup> così come per alcuni isoenzimi rappresentativi delle famiglie  $\beta$ - e  $\gamma$ -CA. Recentemente è stato dimostrato che due isoforme di CA sono associate al cancro, dove esse sono coinvolte nella regolazione del pH e nella progressione del tumore. Recenti approcci nel capire il loro ruolo hanno portato allo sviluppo di nuovi inibitori dell'anidrasi carbonica come agenti terapeutici antitumorali e/o diagnostici.

## 2. MECCANISMO CATALITICO DELLE ANIDRASI CARBONICHE E LORO INIBIZIONE <sup>[5]</sup>

Il meccanismo catalitico delle CAs è il seguente<sup>[6]</sup>: in tutte le classi di enzimi la specie cataliticamente attiva è rappresentata da una specie metallica idrossilata ( $L_3-M^{2+}-OH^-$ ) dell'enzima, la quale agisce come un forte nucleofilo (a pH neutro) sulla molecola di  $CO_2$  all'interno di una tasca idrofobica nelle vicinanze. Questa specie metallica idrossilata si genera dall'acqua coordinata con lo ione metallico, il quale si trova in fondo alla cavità del sito attivo.

Il centro attivo normalmente comprende:

- Ioni  $M(II)$  in una geometria tetraedrica
- Tre proteine Ligande (L)
- Una molecola di acqua/ione idrossido.

Sono stati osservati anche lo  $Zn(II)$  e il  $Co(II)$  nelle geometrie di coordinazione trigonale bipyramidale o ottaedrica, per lo meno nelle  $\gamma$ -CAs.



**Figura 2.** *Struttura delle anidrase carboniche.*



In molti enzimi lo stadio caratteristico del turnover catalitico è rappresentato dalla formazione della specie metallica idrossilata dal metallo coordinato con l'acqua. Le CAs sono fra i più efficaci catalizzatori conosciuti in natura.

I ligandi ionici metallici sono rappresentati da tre residui d'istidina (His) negli  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -CAs o una istidina e due residui di cisteina (Cys) nei  $\beta$ - e  $\zeta$ -CAs. Qualche enzima della classe  $\beta$  ha quattro ligandi zinco-proteina, che sono: un'istidina, due cisteine e un acido aspartico (Asp) coordinato allo Zn(II). Per questi enzimi l'acqua non è coordinata allo ione metallico a valori di pH inferiori a 8, come mostrato da un lavoro di cristallografia del gruppo di Jones sugli enzimi micobatterici Rv3558 e Rv1284<sup>[7]</sup>. Tuttavia a valori di pH > 8, un residuo di Arginina (Arg) conservato in tutte le  $\beta$ -CAs studiate finora (appartenenti all'elemento bivalente catalitico) forma un ponte salino con l'acido aspartico (Asp) coordinato allo Zn(II), liberando la quarta posizione di coordinazione dello Zn(II), la quale viene poi occupata dall'ingresso di una molecola di acqua/ione idrossido.

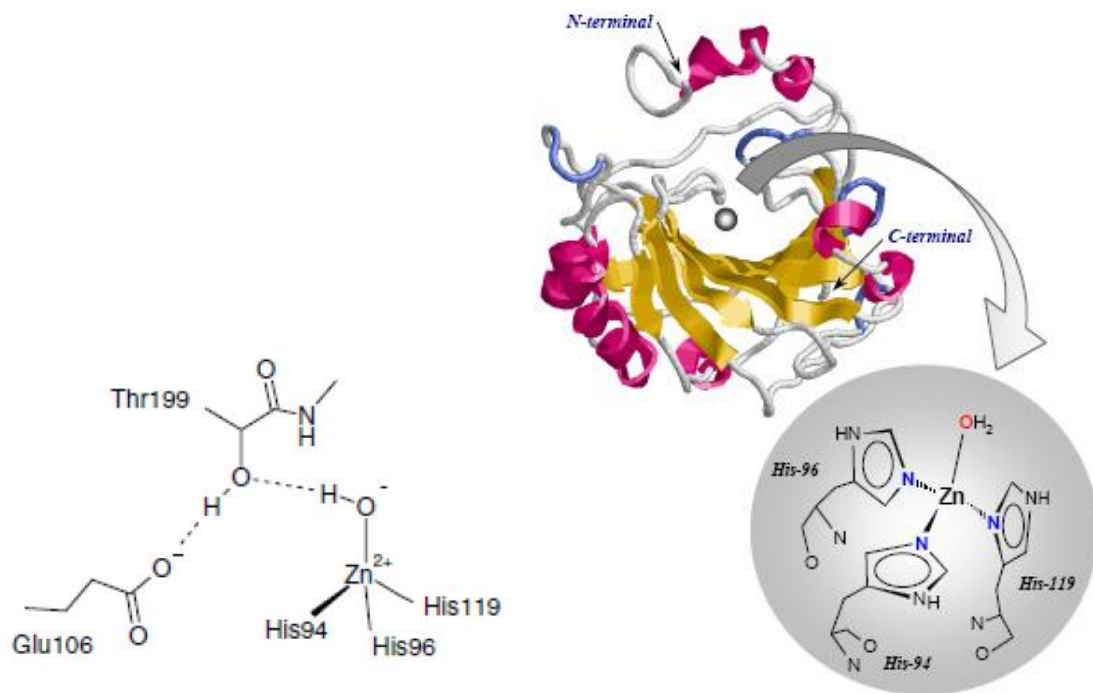
L'inibizione e l'attivazione delle CAs sono processi ben conosciuti: la maggior parte degli inibitori si lega al centro del metallo, mentre gli attivatori si legano all'ingresso della cavità del sito attivo e partecipano allo spostamento dei protoni tra lo ione metallico legato a una molecola di acqua e l'ambiente. Questo porta all'aumento della formazione del metallo idrossilato e quindi della specie cataliticamente attiva dell'enzima <sup>[8,9]</sup>.

## 2.1. $\alpha$ -CAs

Per l'attività catalitica è essenziale lo ione metallico (come lo Zn(II) presente in tutte le  $\alpha$ -CAs studiate fino ad ora) <sup>[1,2]</sup>.

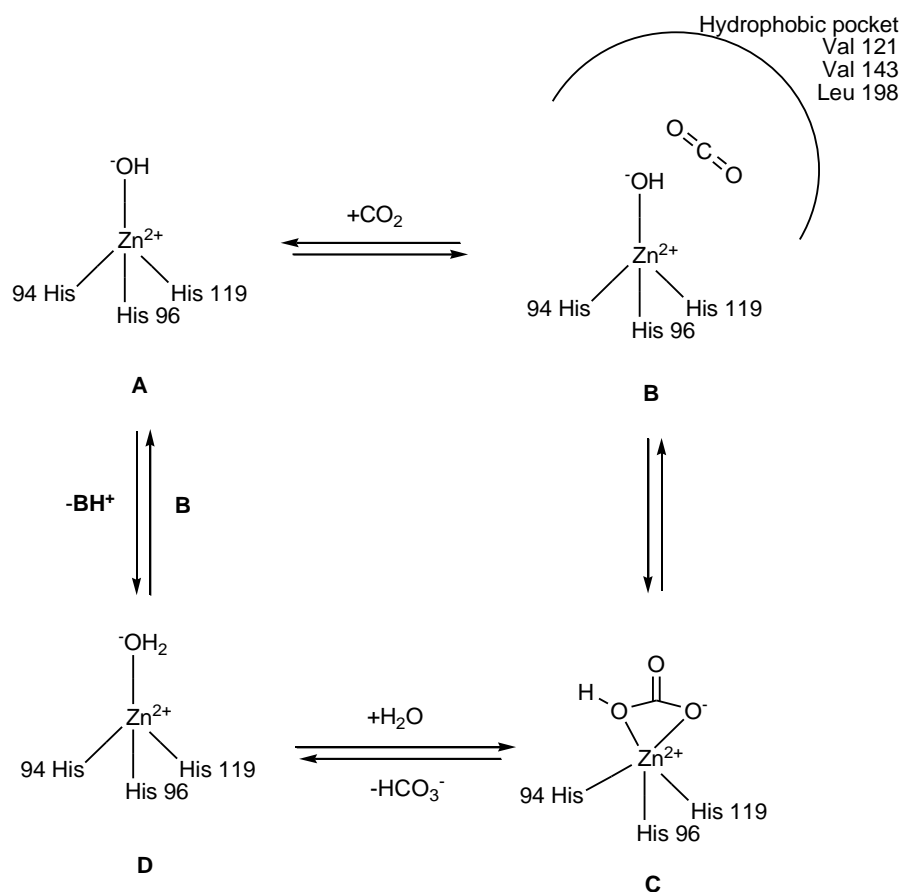
I dati cristallografici a raggi X della struttura cristallina, hanno dimostrato che lo ione metallico (zinco) è situato nella tasca del sito attivo che è una cavità idrofobica, profonda 15 Å (**Figura 3**), ed è coordinato con tre residui istidinici (His94, His96 e His119), in particolare attraverso i gruppi imidazolici ed una molecola di acqua/ione idrossido <sup>[1,2]</sup>.

La geometria di coordinazione è tetraedrica ma distorta.



**Figura 3.** *Struttura delle  $\alpha$ -CAs*

L'acqua legata allo ione zinco è anche impegnata nella formazione di un legame a idrogeno con l'ossidrilico della Thr199, che a sua volta è collegata con il carbossilato del Glu106; queste interazioni orientano il substrato ( $\text{CO}_2$ ) in una posizione favorevole per l'attacco nucleofilo, incrementando la nucleofilicità della molecola di acqua legata allo zinco (**Figura 4**) <sup>[1,2]</sup>.

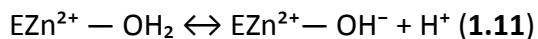
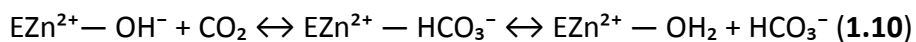


**Figura 4.** Ruolo della molecola di acqua legata allo zinco.

La forma attiva dell'enzima è la base, con l'idrossido legato allo  $Zn(II)$  (**Fig. 4A**). Questo forte nucleofilo attacca la molecola di  $CO_2$  legata in una tasca idrofobica nelle sue vicinanze (il sito di legame del substrato comprende residui di Val121, Val143 e di Leu198 nel caso dell'isoenzima umano CA II) (**Fig. 4B**), portando alla formazione di bicarbonato coordinato allo  $Zn(II)$  (**Fig. 4C**).

Lo ione bicarbonato viene poi spiazzato da una molecola d'acqua e liberato in soluzione, portando alla forma acida dell'enzima, con la molecola d'acqua coordinata allo  $Zn(II)$  (**Fig. 4D**), che è la forma cataliticamente inattiva <sup>[1,2]</sup>. Al fine di rigenerare la base, ha luogo una reazione di trasferimento di un protone dal sito attivo all'ambiente circostante, che può essere sostenuta sia da residui del sito attivo (come l'His64- il protone navetta degli isoenzimi I, II, IV, VII, IX, XII-XIV tra gli altri), che da tamponi presenti nel mezzo.

Il processo può essere rappresentato dalle equazioni (1.10) e (1.11):

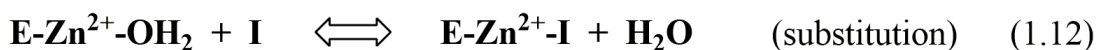


Il passaggio chiave della catalisi è il trasferimento del protone, rappresentato nella seconda reazione, in cui si rigenera la specie Zn-idrossido dell'enzima <sup>[1,2,10]</sup>. Negli isoenzimi cataliticamente molto attivi, come CA II, CA IV, CA VII e CA IX, il processo avviene ad opera di un residuo di istidina posto all'ingresso del sito attivo (His64) e da un gruppo di istidine, che sporgono dal bordo del sito attivo sulla superficie dell'enzima, assicurando così un processo di trasferimento di protoni molto efficace per l'isoenzima CA II <sup>[10]</sup>. Ciò spiega anche perché CA II sia uno degli enzimi più attivi (con una  $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e fornisce anche importanti basi per la progettazione di suoi inibitori con applicazioni cliniche <sup>[1,2,10]</sup>.

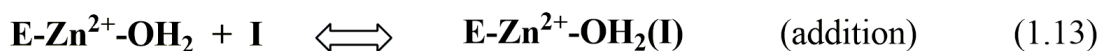
Sono note due principali classi di inibitori CA (CAIs):

- Gli anioni complessanti il metallo
- Le solfonammidi non sostituite.

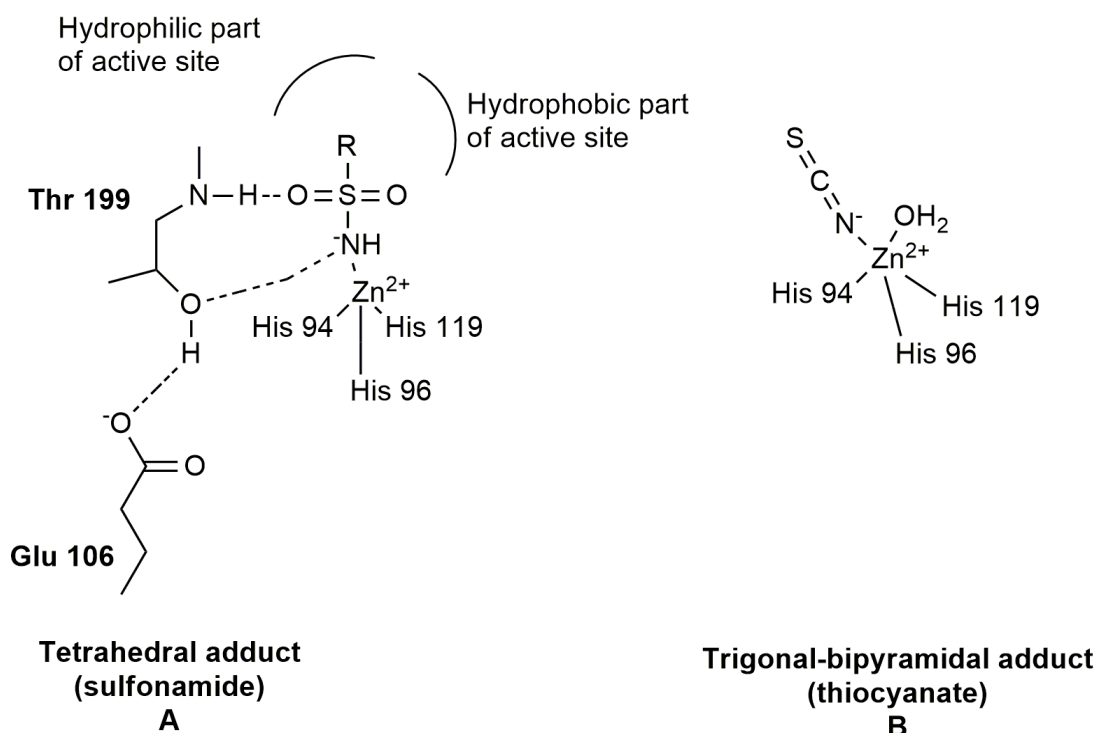
Le solfonammidi, che sono i più importanti inibitori delle anidrasi carboniche, legano lo ione Zn(II) con una geometria tetraedrica (**Fig. 5A**), allo stato deprotonato, con l'atomo di azoto della solfonammide coordinato allo Zn(II) e formano un'estesa rete di legami a idrogeno, coinvolgendo residui di Thr199 e di Glu106, che partecipano anche all'ancoraggio della molecola di inibitore allo ione metallico. La parte aromatica/eterociclica dell'inibitore (R) interagisce con residui idrofilici e idrofobici della cavità. Questo meccanismo d'azione è svolto anche dai derivati solfonamidici usati in clinica come: l'acetozolamide, la metazolamide, l'etossizolamide, la diclorofenamide, la dorzolamide e la brinzolamide <sup>[12]</sup>. Gli anioni si possono legare sia con una geometria tetraedrica allo ione metallico (1.12), sia come addotti trigonali-bipiramidali (1.13), come ad esempio l'addotto tiocianato mostrato in **Fig. 5B** <sup>[11,12]</sup>.



#### Tetrahedral adduct



#### Trigonal-bipyramidal adduct



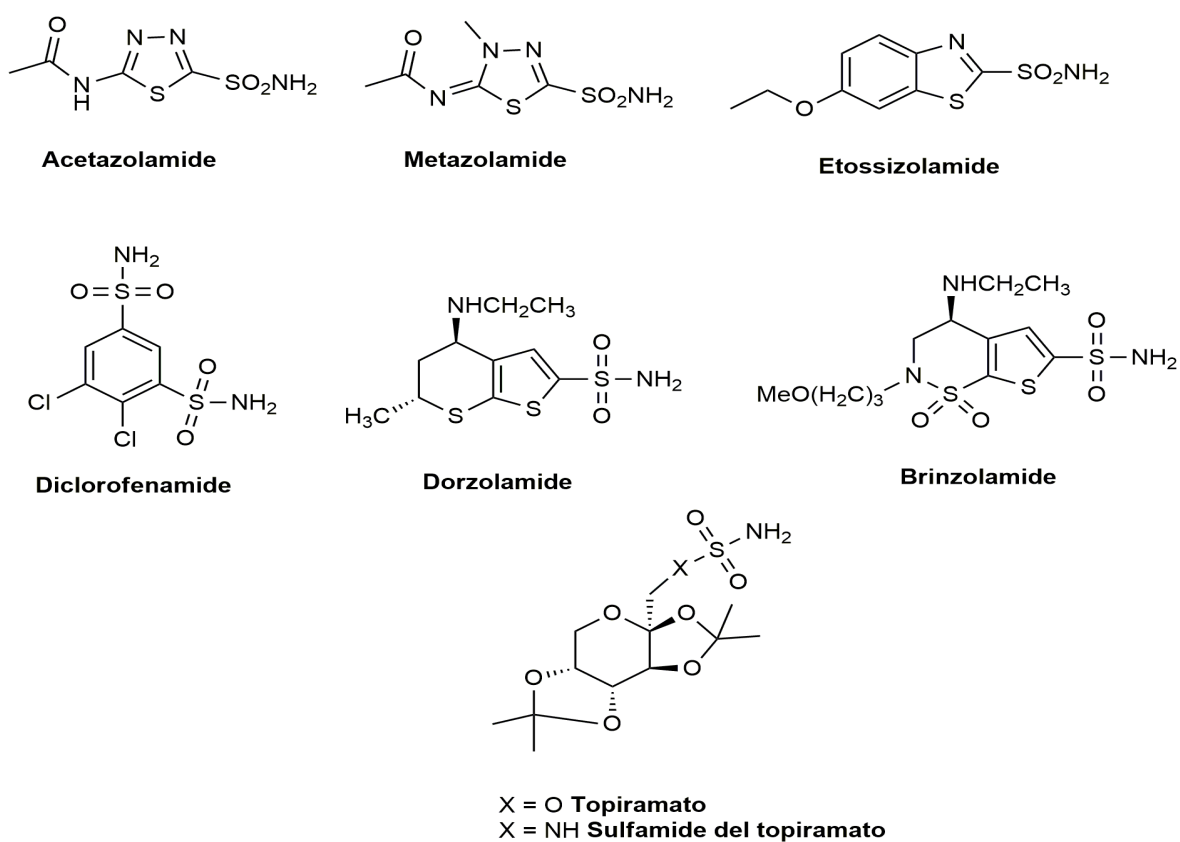
**Figura 5.** Interazione del CAIs con lo ione  $\text{Zn}^{2+}$

### 3. UTILIZZO CLINICO GENERALE DEGLI INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA.

Sono stati sviluppati e impiegati clinicamente quattro tipi di solfonammidi CAI come farmaci antiglaucoma: acetazolamide, metazolamide, etossizolamide e diclorofenamide [12]. Dai dati della **Tabella 2**, si può osservare che, i composti riportati inibiscono fortemente la maggior parte degli isoenzimi CA (CA I, CA II, CA IV, CA V, CA VII, CA IX, CA XII-XIV) e molti di essi presentano un'affinità nel range del basso nanomolare.

Ad oggi sono stati introdotti in pratica clinica due nuovi farmaci a struttura solfonammidica per uso topico, la dorzolamide e la brinzolamide, risultati potenti inibitori della maggior parte degli isoenzimi  $\alpha$ -CA (**Tabella 2**).

Nella **Tabella 2** sono riportati i dati di inibizione verso gli isoenzimi umani cataliticamente attivi, di composti utilizzati in clinica, come le solfonammidi, il topiramato ed il suo derivato sulfamidico (**Figura 6**).



**Figura 6.** *Composti utilizzati in ambito clinico*

**Tabella 2:** *Dati di inibizione di composti utilizzati in clinica verso gli isoenzimi umani cataliticamente attivi.*

Composto	Isoenzima K <sub>i</sub> (nM)											
	CA I	CA II	CA III	CA IV	CA VA	CA VB	CA VI	CA VII	CA IX	CA XII	CA XIII	CA XIV
<b>Acetazolamide</b>	250	12	3.10	74	63	54	11	2.5	25	5.7	17	41
<b>Metazolamide</b>	50	14	1.10	6200	65	62	10	2.1	27	3.4	19	43
<b>Etossizolamide</b>	25	8	5000	93	25	19	43	0.8	34	22	NT	25
<b>Diclorofenamie</b>	1200	38	NT	15000	630	21	79	26	50	50	23	345
<b>Dorzolamide</b>	50000	9	8000	8500	42	33	10	3.5	52	3.5	18	27
<b>Brinzolamide</b>	45000	3	NT	NT	50	30	0.9	2.8	37	3.0	NT	24
<b>Topiramato</b>	250	10	NT	4900	63	30	45	0.9	58	3.8	47	1460
<b>Topiramato sulfamide</b>	3450	2135	NT	941	32	21	NT	35	4580	1875	30	25

I diversi isoenzimi sono responsabili di differenti risposte biologiche, per questo il loro diverso profilo d'inibizione può spiegare le reali applicazioni cliniche dei CAI come farmaci diuretici, antiglaucoma, antitumorali, anti-obesità e anti-epilettici. Il problema nella progettazione di nuovi CAI riguarda l'elevato numero di isoforme di CA, la loro diffusa localizzazione in molti tessuti e organi (**Tabella 3**) e la mancanza di selettività degli inibitori attualmente disponibili nei confronti dei diversi isoenzimi.

**Tabella 3:** Localizzazione delle diverse isoforme di CA in tessuti e organi.

Isozyme	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$K_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	$K_i$ (nM)	Localizzazione subcellulare	Tessuto/organo di localizzazione
<b>hCA I</b>	$2.0 \times 10^5$	4.0	$5.0 \times 10^7$	250	Citosol	Eritrociti, tratto GI
<b>hCA II</b>	$1.4 \times 10^6$	9.3	$1.5 \times 10^3$	12	Citosol	Eritrociti, occhi, tratto GI, osteoclasti ossei, rene, polmone, testicoli, cervello
<b>hCA III</b>	$1.0 \times 10^6$	33.3	$3.0 \times 10^5$	$2.1 \times 10^3$	Citosol	Muscolatura scheletrica, adipociti
<b>hCA IV</b>	$1.1 \times 10^3$	21.5	$5.1 \times 10^7$	74	Legato alla membrana	Rene, polmone, pancreas, cervello, capillare, colon, muscolo cardiaco
<b>hCA VA</b>	$2.9 \times 10^5$	10.0	$2.9 \times 10^7$	63	Mitocondrio	Fegato
<b>hCA VB</b>	$9.5 \times 10^5$	9.7	$9.8 \times 10^7$	54	Mitocondrio	Muscolatura scheletrica e cardiaca, pancreas, midollo spinale, rene, tratto GI
<b>hCA VI</b>	$3.4 \times 10^5$	6.9	$4.9 \times 10^7$	11	Secreto nella saliva/latte	Ghiandole mammarie e salivari
<b>hCA VII</b>	$9.5 \times 10^5$	11.4	$8.3 \times 10^7$	2.5	Citosol	CNS
<b>hCA VIII</b>	ND	ND	ND	ND	Citosol	CNS
<b>hCA IX</b>	$3.8 \times 10^5$	6.9	$5.5 \times 10^7$	25	Transmembrana	Tumori, mucosa GI
<b>hCA X</b>	ND	ND	ND	ND	Citosol	CNS
<b>hCA XI</b>	ND	ND	ND	ND	Citosol	CNS
<b>hCA XII</b>	$4.2 \times 10^5$	12.0	$3.5 \times 10^7$	5.7	Transmembrana	Rene, intestino, epiteli riproduttivi, occhi, tumori
<b>hCA XIII</b>	$1.5 \times 10^5$	13.8	$1.1 \times 10^7$	16	Citosol	Rene, cervello, polmoni, tratto riproduttivo
<b>hCA XIV</b>	$3.1 \times 10^3$	7.9	$3.9 \times 10^7$	41	Transmembrana	Rene, cervello Fegato
<b>mCA XV</b>	$4.7 \times 10^4$	14.2	$3.3 \times 10^7$	72	Legato alla membrana	Rene

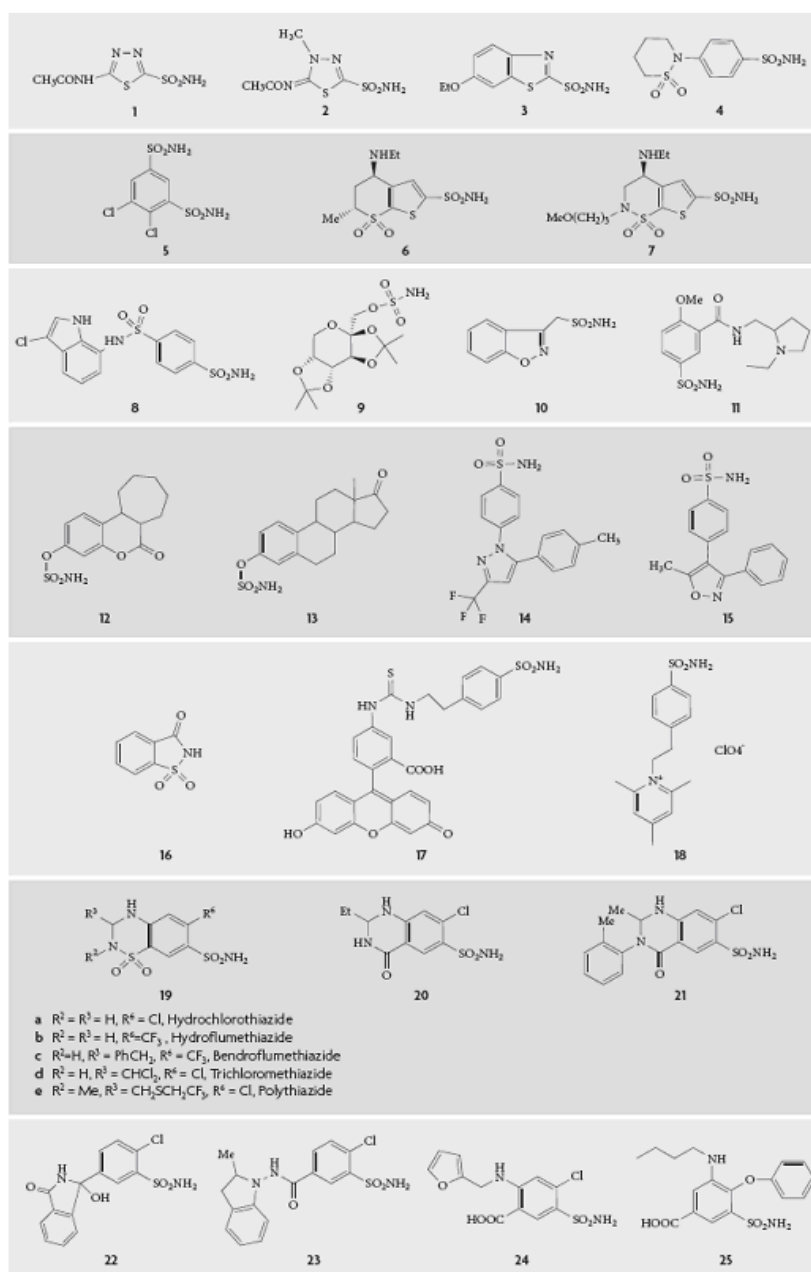


I classici inibitori della CA (CAIs) sono le solfonammidi primarie,  $R-SO_2-NH_2$  che, da ormai più di 50 anni, vengono utilizzate clinicamente come diuretici e farmaci antiglaucoma per uso sistemico. Ci sono circa 30 farmaci usati clinicamente (o farmaci in via di sviluppo) che appartengono alla classe delle solfonammidi o dei sulfamati (**Figura 7, 1-25**), che hanno mostrato una significativa attività inibitoria della CA. Oltre all'impiego clinico di questi CAIs come agenti diuretici ed antiglaucoma, sono emerse recentemente le loro proprietà anticonvulsivanti, anti-obesità, antitumorali, antipánico ed anti-infettive <sup>[13,14]</sup>.

I punti critici per la progettazione di nuovi CAIs come agenti terapeutici, riguardano:

- L'elevato numero d'isoforme negli umani (16 CAs, di cui 13 hanno attività catalitica),
- La loro diffusa localizzazione in molti tessuti/organi,
- La mancanza di selettività dell'isoenzima nei confronti degli inibitori solfonamidici/sulfamati attualmente disponibili <sup>[13,14]</sup>.

Tra i derivati **1-25** non ci sono composti che inibiscono selettivamente una specifica isoforma di CA con valori terapeutici. Tuttavia il loro profilo d'inibizione dei 13 isoenzimi di mammiferi è molto variabile e possono essere utilizzati per la progettazione di farmaci di nuova generazione, quali inibitori isoforma-selettivi.



**Figura 7.** Farmaci usati clinicamente o in via di sviluppo, appartenenti alla classe delle solfonammidi o dei sulfamati, che hanno dimostrato attività inibitoria della CA.

Gli effetti inibitori dei farmaci riportati in **Figura 7**, verso le isoforme di anidrasi carbonica presenti nei mammiferi di origine umana o di topo, sono mostrati in **Tabella 4**.

**Tabella 4:** Effetti inibitori di alcuni farmaci usati clinicamente verso le isoforme presenti nei mammiferi CA I-XIV, di origine umana o di topo.

	K <sub>i</sub> (nm) Isozyme (h= human, m=mouse)											
	hCA I	hCA II	hCA III	hCA IV	hCA VA	hCA VB	hCA VI	hCA VII	hCA IX	hCA XII	mCA XIII	hCA XIV
1	250	12	2x10 <sup>5</sup>	74	63	54	11	2,5	25	5,7	17	41
2	50	14	7x10 <sup>5</sup>	6.200	65	62	10	2,1	27	3,4	19	43
3	25	8	1x10 <sup>6</sup>	93	25	19	43	0,8	34	22	50	2,5
4	374	9	6,3x10 <sup>3</sup>	95	81	91	134	6	43	56	1.540	1.540
5	1.200	38	6,8x10 <sup>3</sup>	15.000	630	21	79	26	50	50	23	345
6	50.000	9	7,7x10 <sup>5</sup>	8.500	42	33	10	3,5	52	3,5	18	27
7	45.000	3	1,1x10 <sup>3</sup>	3.950	50	30	0,9	2,8	37	3,0	10	24
8	31	15	10.400	65	79	23	47	122	24	3,4	11	106
9	250	10	7,8x10 <sup>5</sup>	4.900	63	30	45	0,9	58	3,8	47	1.460
10	56	35	2,2x10 <sup>3</sup>	8.590	20	6.033	89	117	5,1	11.000	430	5.250
11	12.000	40	10.600	6,5x10 <sup>5</sup>	174	18	0,8	3.630	46	3,9	295	110
12	3.450	21	7,0x10 <sup>2</sup>	24	765	720	653	23	34	12	1.050	755
13	37	10	6,5x10 <sup>3</sup>	NT	NT	NT	NT	NT	30	7,5	NT	NT
14	50.000	21	7,4x10 <sup>4</sup>	880	794	93	94	2.170	16	18	98	689
15	54.000	43	7,8x10 <sup>4</sup>	1.340	912	88	572	3.900	27	13	425	107
16	18.540	5.950	1,0x10 <sup>3</sup>	7.920	10.060	7.210	935	10	103	633	12.100	773
17	1.300	45	1,3x10 <sup>5</sup>	650	134	76	145	18	24	5	76	33
18	4.000	21	3,1x10 <sup>5</sup>	60	88	70	65	15	14	7	21	13
19°	328	290	7,9x10 <sup>5</sup>	427	4.225	603	3.655	5.010	367	355	3.885	4.105
20	35.000	1.260	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
21	54.000	2.000	6,1x10 <sup>5</sup>	216	750	312	1.714	21	320	5,4	15	5.432
22	348	138	1,1x10 <sup>4</sup>	196	917	9	1.347	28	23	4,5	15	4.130
23	51.900	2.520	2,3x10 <sup>3</sup>	213	890	274	1.606	0,23	36	10	13	4.950
24	62	65	3,2x10 <sup>3</sup>	564	499	322	245	513	420	261	550	52
25	4.930	6.980	3,4x10 <sup>3</sup>	303	700	NT	NT	NT	25,8	212	2.570	250

### 3.1. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA PER IL TRATTAMENTO DEL GLAUCOMA.

Il glaucoma è una patologia oculare cronica degenerativa, dovuta ad un aumento della pressione oculare (IOP) che causa danni irreversibili al nervo ottico, provocando una perdita progressiva della vista ed eventuale cecità <sup>[15-17]</sup>.

In condizioni normali all'interno dell'occhio è presente un liquido definito umore acqueo, che viene prodotto dai corpi ciliari, ricchi di vasi sanguigni. Normalmente alla sua formazione corrisponde un pari deflusso che avviene tramite il canale di Schlemm e piccoli canali collettori che lo convogliano verso il plesso venoso episclerale e ciò permette di mantenere costante la pressione intraoculare. Nel caso in cui il sistema di deflusso non funzioni correttamente, si ha un accumulo di umore acqueo che provoca un aumento della pressione intraoculare.

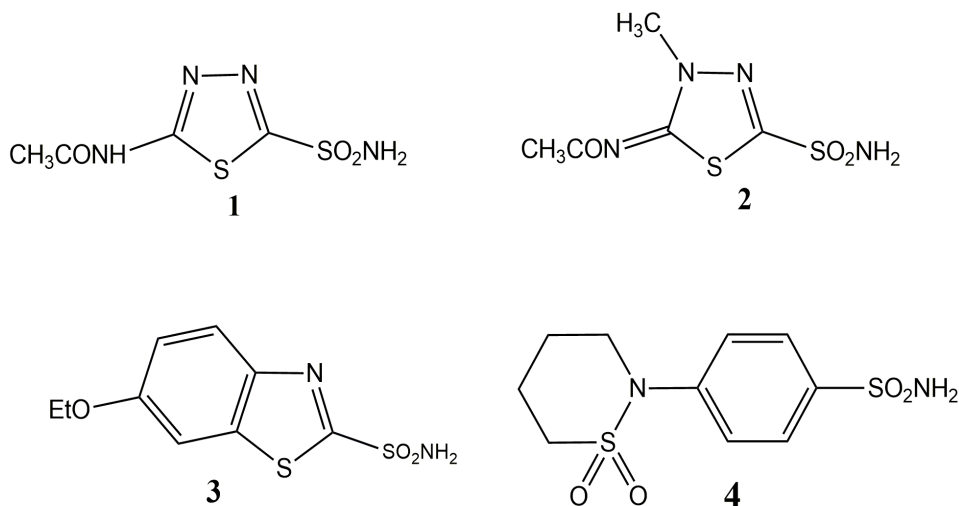
Esistono diversi tipi di glaucoma: il glaucoma primario, a sua volta diviso in glaucoma ad angolo aperto e in glaucoma ad angolo stretto; il glaucoma congenito; il glaucoma secondario.

Studi sulla chimica e sulla dinamica dell'umore acqueo hanno stabilito che il principale costituente della sua secrezione è rappresentato dal bicarbonato di sodio.

Le CAs sono state identificate nell'uvea anteriore dell'occhio, dove hanno dimostrato essere responsabili della secrezione di bicarbonato.

I CAIs rappresentano la terapia principale per il trattamento del glaucoma, in quanto inibiscono l'enzima del processo ciliare (l'isoenzima CA II solfonammido sensibile, **Tabella 4**) e determinano quindi una riduzione della secrezione di bicarbonato e di umore acqueo, causando il 25-30% di riduzione della pressione intraoculare <sup>[15]</sup>.

L'acetazolamide (**1**) per via sistemica, la metazolamide (**2**), l'etossizolamide (**3**) o la diclorofenamide (**4**) sono molto utilizzate per il trattamento di questo disturbo.



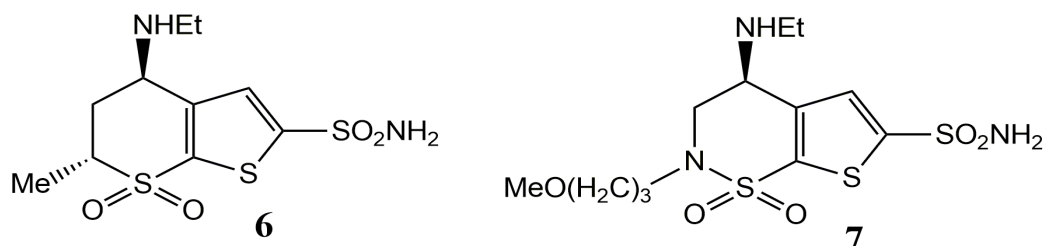
Uno dei farmaci più utilizzato è l'Acetazolamide (**1**, il cui nome commerciale è Diamox®), la quale spesso viene somministrata per lunghi periodi in quanto riduce notevolmente la pressione intraoculare; possiede inoltre minima tossicità e proprietà farmacocinetiche ideali.

La somministrazione delle solfonammidi per via sistemica porta all'inibizione non specifica delle CAs espresse a livello dei processi ciliari degli occhi (ad esempio la CA II, IV e XII), in quanto le CAs sono espresse in maniera ubiquitaria nei vertebrati.

La mancanza di selettività causa effetti indesiderati come torpore e formicolio delle estremità, sapore metallico, depressione, fatica, malessere, perdita di peso, diminuzione della libido, irritazione gastrointestinale, acidosi metabolica, calcoli renali e miopia transitoria.

Lo sviluppo di solfonammidi solubili in acqua come inibitori della anidrasi carbonica, da utilizzare sottoforma di gocce oculari, iniziò nel 1990 e dal 1995 il primo agente farmacologico, la Dorzolamide (**6**), è stato lanciato dalla Merck con il nome commerciale di Trusopt® [6].

Un secondo composto strutturalmente simile, la Brinzolamide (**7**), introdotto dalla Alcon con il nome commerciale di Azopt® [6], è stato approvato per il trattamento topico del glaucoma in associazione a  $\beta$ -bloccanti come il Timololo (Timoptol®) e in associazione ad analoghi della PGF2 $\alpha$  [18], al latanoprost (Xalatan®) e al travoprost (Travatan®).



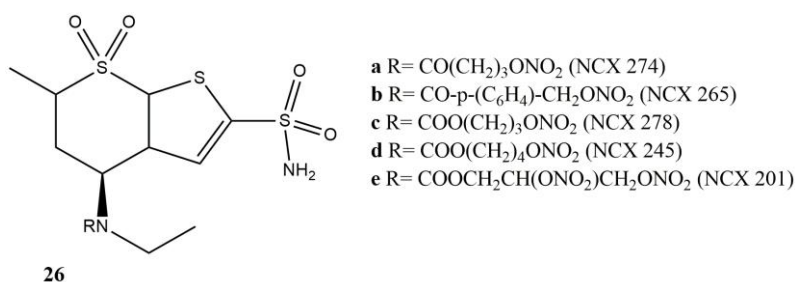
La Dorzolamide e la Brinzolamide sono potenti inibitori dell'anidrasi carbonica solubili in acqua, inoltre sono sufficientemente liposolubili per penetrare la cornea e quindi possono essere somministrati rispettivamente per via topica come sali (a un pH di 5.5) o come basi libere. Questi due farmaci risultano essere efficaci nel ridurre la pressione intraoculare e mostrano minori effetti collaterali rispetto ai farmaci utilizzati per via sistemica.

Gli effetti collaterali osservati per questi due farmaci sono probabilmente dovuti al pH acido della soluzione oculare di Dorzolamide e includono: dolore, bruciore e arrossamento degli occhi, visione sfuocata e prurito. E' stato riscontrato anche un sapore amaro con entrambi i farmaci CAIs sia in seguito ad uso sistemico che topico, probabilmente causato dall'accumulo di farmaco a livello oculare che defluisce nell'orofaringe e che inibisce le anidrasi carboniche presenti nella saliva (CA VI) e nelle papille gustative (CA II e CA VI) con il conseguente accumulo di bicarbonato.

Questi composti vengono utilizzati con lo scopo di controllare il flusso di umore acqueo e quindi mantenere sotto controllo la pressione intraoculare nei pazienti con glaucoma <sup>[19]</sup>.

Nuovi efficaci inibitori dell'anidrasi carbonica quali potenziali agenti antiglaucoma sono ancora in via di sviluppo <sup>[17]</sup>.

E' stato proposto un altro approccio per ottenere inibitori delle anidrasi carboniche (CAIs) antiglaucoma <sup>[19]</sup> che consiste nell'inserimento, sullo scheletro della Dorzolamide (**6**), di esteri nitrici, portando così a composti del tipo **26**.



Alcuni di questi composti hanno mostrato un'elevata potenza ed efficacia NO-mediata, come provato dal loro effetto rilasciante vascolare sull'anello aortico dei conigli pre-contratto da metoxamina; inoltre hanno dimostrato di poter abbassare fortemente la pressione intraoculare *in vivo* nei conigli normotesi <sup>[19]</sup>.

Sono stati preparati dendrimeri legati a diverse porzioni benzensulfonammidiche che mostrano un aumento dell'inibizione dell'anidrasi carbonica, in particolare per le isoforme CA II e CA XII coinvolte nel glaucoma.

È stato dimostrato che la somministrazione cronica di tali dendrimeri per 5 giorni, ha portato ad una riduzione molto più efficiente della pressione intraoculare rispetto all'utilizzo di Dorzolamide. <sup>[20]</sup>.

Gli inibitori delle anidrasi carboniche possono essere utilizzati anche per il trattamento dell'edema maculare, patologia multifattoriale che colpisce la zona centrale della retina, detta macula. E' ad andamento progressivo e può portare alla perdita completa ed irreversibile della visione centrale.

Efficaci nel trattamento dell'edema maculare sono: l'acetazolamide (sale sodico), la dorzolamide e la brinzolamide <sup>[16]</sup>.

La scomparsa dell'edema ed il miglioramento della vista sono indipendenti dall'attività ipotensiva della solfonammide, ma sembra essere dovuta agli effetti diretti sulla circolazione nella retina. L'acetazolamide, la dorzolamide o la brinzolamide agiscono, probabilmente, come vasodilatatori locali, migliorando il flusso di sangue a livello dell'occhio e di conseguenza eliminando i prodotti di scarto metabolico.

La visione viene notevolmente migliorata, in seguito al trattamento con questi composti nelle fasi iniziali del disturbo <sup>[16]</sup>.

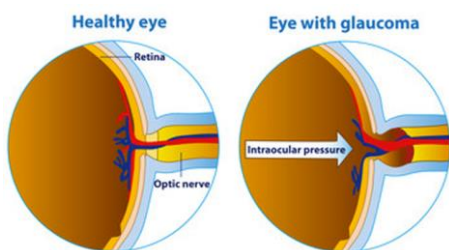
La retinopatia diabetica proliferativa e l'edema maculare diabetico rappresentano le principali cause della perdita della vista e attualmente non sono presenti trattamenti

farmacologici risolutivi. Però è stato dimostrato che l'inibizione della CA I (isoenzima citosolico che media la permeabilità retinale emorragica e quella vascolare cerebrale attraverso l'attivazione della precallicreina e la generazione di una serina proteasi altamente attiva, che è il fattore XIIa <sup>[21]</sup>) può essere un bersaglio terapeutico per il trattamento di queste patologie. Attualmente sono disponibili potenti inibitori della CA I. Alcune isoforme associate alla membrana, come la CAIV, IX e la XII, sono anche considerate possibili bersagli delle solfonammidi antiglaucoma <sup>[22-24]</sup>.

L'isoenzima bovino CA IV si è dimostrato sensibile all'inibizione da parte di molte solfonammidi e sulfamati, con una  $K_i$  nel range del basso nanomolare <sup>[22]</sup>. La corrispondente isoforma umana, CA IV, però mostra un diverso funzionamento nei confronti di qualche farmaco: l'acetazolamide, l'etossizolamide e il sultiame agiscono come potenti inibitori, mentre altri agenti antiglaucoma, come la metazolamide, la diclorofenamide, la dorzolamide e la brinzolamide, agiscono come deboli inibitori (**Tabella 4**); ciò suggerisce che è improbabile che la CA IV sia coinvolta nella secrezione dell'umore acqueo, dato che viene inibito debolmente dalla maggior parte delle solfonammidi antiglaucoma.

Tuttavia, la CA XII (ma non la CA IX) ha recentemente mostrato di essere altamente espressa negli occhi di pazienti con glaucoma e probabilmente gioca un ruolo importante nell'aumento della pressione intraoculare caratteristica del disturbo <sup>[24]</sup>.

Successivamente è stato dimostrato che la CA XII viene altamente inibita da tutte le solfonammidi antiglaucoma usate clinicamente (**Tabella 4**) e dunque, questa è probabilmente l'isoforma di membrana coinvolta nel glaucoma, che viene bersagliata da questi agenti farmacologici.



**Figura 8.** Aumento della pressione intraoculare



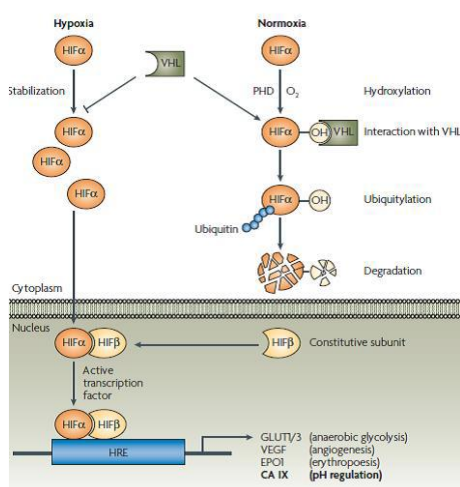
### 3.2. INIBITORI DELLA ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI COME POTENZIALI FARMACI ANTITUMORALI [24]

Una caratteristica importante dei tumori è l'ipossia [26]. Il tumore, quindi, è caratterizzato da un inadeguato rifornimento di ossigeno. L'ipossia nei tumori sembra essere associata alla propagazione del tumore, alla sua trasformazione in maligno, alla sua eventuale resistenza alla chemioterapia ed alla radioterapia.

L'ipossia regola l'espressione di differenti geni, incluso l'isoenzima CA IX, attraverso la cascata del fattore d'ipossia inducibile 1 (HIF1).

L'espressione della CA IX è sovra-regolata dall'ipossia e sotto-regolata dalla proteina soppressitrice di tumori *wild type* di Von Hippel-Lindau (pVHL) (Figura 9) [26].

In alcune cellule cancerogene, il gene VHL risulta essere mutato e ciò causa una forte sovra-espressione della CA IX (fino a 150 ripiegamenti) come conseguenza dell'attivazione dell'HIF costitutiva. La sua sovraespressione è correlata con una prognosi sfavorevole in un'ampia varietà di neoplasie: come il carcinoma dell'esofago, del polmone, e quello mammario. L'ipossia, attraverso la cascata dell'HIF, porta ad un'alta sovra-espressione della CA IX in molti tumori. Ciò causa un'alterazione del pH dei tumori ipossici, che infatti assumono un pH acido con valori intorno a 6, in contrasto con i normali tessuti, i quali hanno un pH caratteristico con valori intorno a 7.4.



**Figura 9.** Regolazione dell'espressione della CA IX.

La CA IX appartiene alla famiglia delle  $\alpha$ -CAs umane molto attive e le sue proprietà catalitiche della reazione di idratazione della  $\text{CO}_2$  sono paragonabili a quelle del catalizzatore CA II altamente evoluto.

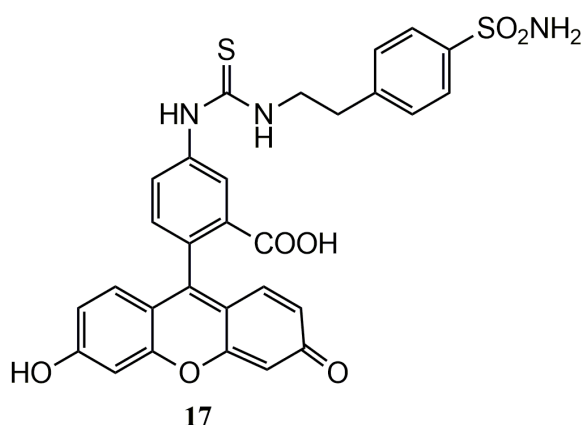
Attualmente la struttura a raggi X della CA IX non è ancora disponibile, quindi è stata utilizzata la struttura della CA II per comprendere le caratteristiche di inibizione della CA IX. Come per tutte le  $\alpha$ -CAs, la CA IX è sensibile all'inibizione da parte di anioni, solfonammidi e sulfamati. Gli inibitori si coordinano direttamente con lo ione zinco dentro la cavità del sito attivo e partecipano a varie interazioni favorevoli con residui amminoacidici, situati nel mezzo idrofobico e idrofilico del sito attivo.

Alcuni anni fa sono stati identificati molti inibitori della CA IX con concentrazioni del basso nanomolare (**Tabella 4**) [27-29].

Studi successivi hanno messo in evidenza anche composti che non permeano la membrana e che quindi inibiscono in modo specifico la CA IX *in vivo* o composti che agiscono come inibitori duali CA IX-COX2.

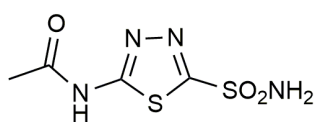
Sia le solfonammidi eterocicliche che aromatiche, come anche le solfonammidi/sulfamati/sulfammidi alifatiche, possiedono un'attività inibitoria nell'ordine del basso nanomolare per le CA IX che sono state scoperte finora.

La maggior parte degli inibitori delle anidrasi carboniche utilizzate per comprendere la funzione di questa proteina *in vivo*, sono stati i composti fluorescenti del tipo **17**.

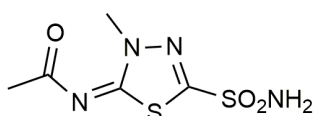


I composti solfonamidici aromatici (classici inibitori delle CAs) hanno mostrato di:

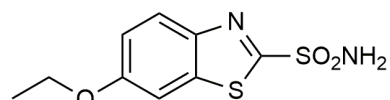
- Invertire l'effetto dell'acidificazione tumorale (composto A)
- Inibire la crescita delle cellule cancerose con valori di  $IC_{50}$  (corrispondenti alla molarità degli inibitori che producono il 50 % di inibizione della crescita delle cellule tumorali dopo 48 ore di esposizione al farmaco) nell'intervallo del micromolare (metazolamide, etossizolamide, indisulam, composti B-D)
- Sopprimere l'invasione del tumore mediata dalle CAs associate al cancro (acetazolamide)



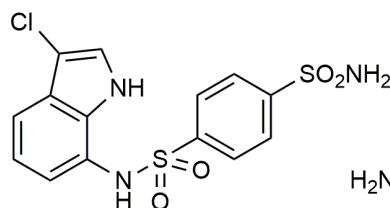
**Acetazolamide**



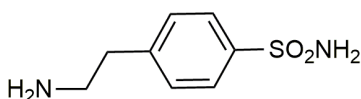
**Metazolamide**



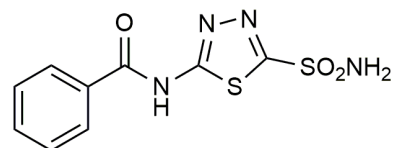
**Etossizolamide**



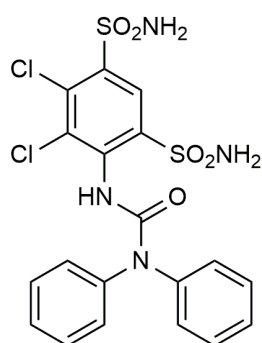
**Indisulam**



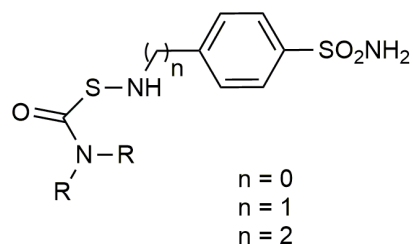
**A**



**B**



**C**



**D**

Teicher e colleghi hanno riportato che l'acetazolamide, se somministrata da sola, riduce la crescita del tumore mentre quando somministrata in combinazione con diversi agenti chemioterapici, ritarda il suo sviluppo <sup>[30]</sup>.

L'indisulam (**8**), derivato solfonamidico (originariamente chiamato E7070), ha recentemente mostrato di agire come inibitore nell'ordine del nanomolare della CA IX (**Tabella 4**)<sup>[31]</sup>.

L'indisulam è attualmente in fase II di sperimentazione clinica e il suo meccanismo d'azione ancora non è ben chiaro. E' comunque noto che è coinvolto nella perturbazione del ciclo cellulare nelle fasi G1 e/o G2, nella sottoregolazione delle cicline, nella riduzione dell'attività della chinasi 2 ciclina dipendente (CDK2), nell'inibizione della fosforilazione della proteina del retinoblastoma (pRb), nell'espressione differenziata di molecole che partecipano all'adesione cellulare, nella risposta di segnale e immunitaria, in aggiunta alle sue proprietà inibitorie nei confronti della CA IX. Ha inoltre dimostrato di avere un'efficacia nel trattamento dei tumori solidi.

Tutti gli inibitori della CA non bersagliano selettivamente le CA IX e XII, perciò essi sono anche capaci di inibire altri isoenzimi della CA (ad esempio la CA I e la CA II) che hanno rilevanza fisiologica.

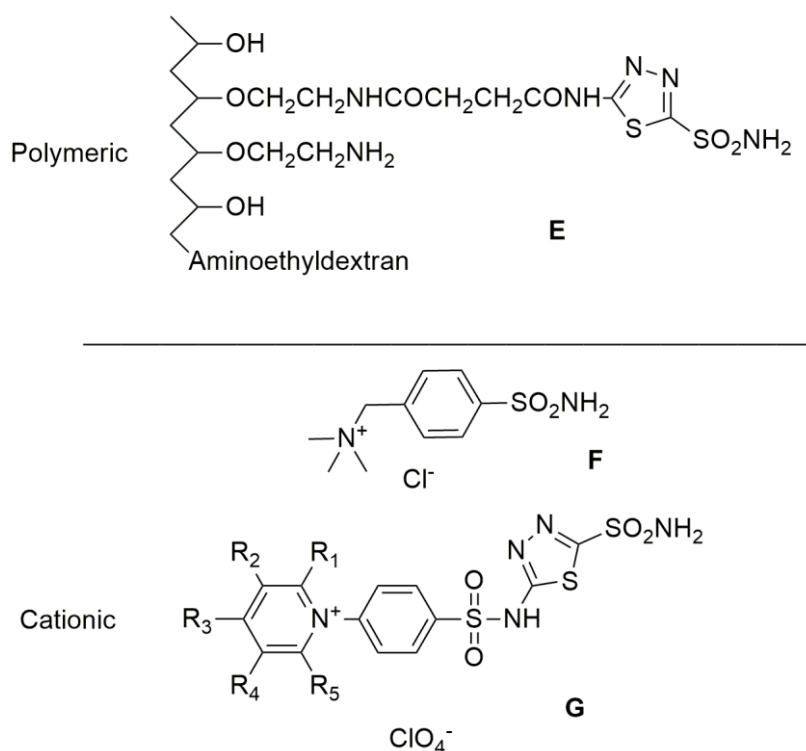
Perciò, negli ultimi anni, sono state proposte delle strategie per ottenere composti che bersaglino in modo specifico le isoforme associate ai tumori.

Gli isoenzimi CA IX e XII hanno delle caratteristiche che le distinguono dalle CA I e II. Sono fisiologicamente denominate isoenzimi IX e XII e sono proteine transmembrana che orientano il loro dominio catalitico CA fuori dalla cellula, mentre gli isoenzimi I e II sono proteine solubili localizzate nel citosol.

Quindi cercare di ottenere solfonammidi aromatiche con una minore capacità di diffondere attraverso la membrana lipidica, è una possibile strategia per ottenere specificità nei confronti degli isoenzimi associati al cancro.

Il primo approccio per indurre l'impermeabilità della membrana agli inibitori della CA, è stato quello di progettare inibitori polimerici ad alto PM (**composto E**). Tuttavia, gli effetti in vivo di questi composti sono stati deludenti a causa di problemi connessi ai polimeri (reazioni allergiche o problemi di biodisponibilità).

Si è pensato, allora, di sviluppare solfonammidi cationiche, ottenute facendo reagire solfonammidi eterocicliche aromatiche contenenti gruppi  $-NH_2$  liberi con sali di pirilio, per ottenere derivati pirimidinici. I composti derivati da **G** hanno mostrato una  $K_i$  nel range del basso nanomolare per la CA IX associata ai tumori ( $K_i$  nell'intervallo di 3-5 nM).



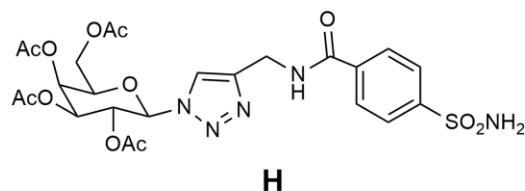
Studi successivi *ex vivo* hanno mostrato che tali composti possono discriminare tra l'isoenzima CA legato alla membrana e quello del citosol.

*In vivo* questi composti, non erano però, in grado di attraversare la membrana plasmatica, quindi, poiché tali composti non inibiscono le CAs intracellulari, possono mostrare minori effetti collaterali confrontandoli con i composti attualmente disponibili (come l'acetazolamide), che inibiscono indiscriminatamente tutte le CAs.

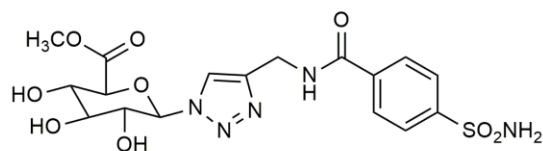
Com'è ben noto, i carboidrati non possono diffondere attraverso la membrana e per questo motivo Wilkinson e colleghi hanno preparato una serie di solfonammidi benzeniche glucoconjugate attaccando, attraverso *click-tailing*, funzioni zuccherine al farmacoforo costituito dalle classiche solfonammidi aromatiche ad alta affinità ( $\text{Ar-SO}_2\text{-NH}_2$ ) [32].

Due composti (**H**, **I**) si sono rivelati molto attivi e selettivi verso la CA IX. Le code zuccherine hanno mostrato di essere fondamentali per ottenere composti selettivi nei confronti degli isoenzimi della CA. Poiché l'ipossia è una caratteristica di molti tumori solidi, un'altra strategia per colpire gli isoenzimi associati ai tumori, è la progettazione di inibitori della CA bioriduttivi, ipossia-attivabili (**composti L e M**).

Solfonammidi benzeniche  
glucoconiugate

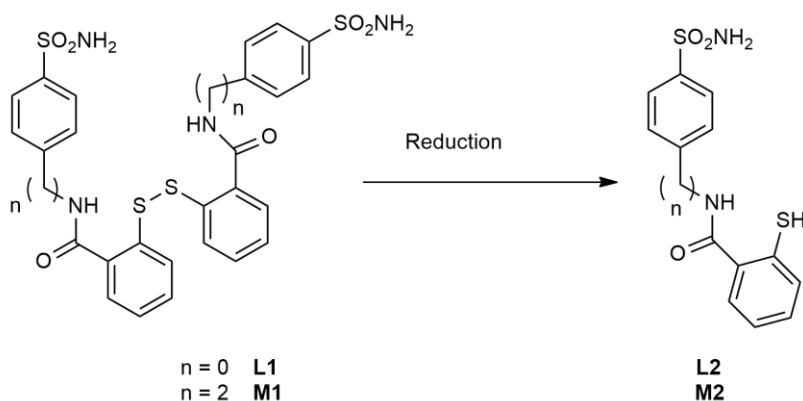


**H**



**I**

Hypoxia-activatable



La strategia è quella di utilizzare le condizioni di riduzione presenti in tali tumori, dove l'ossigeno è meno dell'1%, per convertire un profarmaco inattivo in un inibitore delle anidrasi carboniche. Questo tipo di riduzione, può anche essere mediata dalla proteina riducente tioredoxina-1, che è stata trovata ad alte concentrazioni in molti tipi di tumore umano.

Quindi, sono stati sintetizzati derivati disolfurici delle solfonammidi eterocicliche aromatiche da De Simone e colleghi<sup>[33]</sup>. Inizialmente, tali solfonammidi contenenti disolfuri erano molto ingombranti e quindi incapaci di legarsi all'interno dello spazio ristretto del sito attivo della CA.

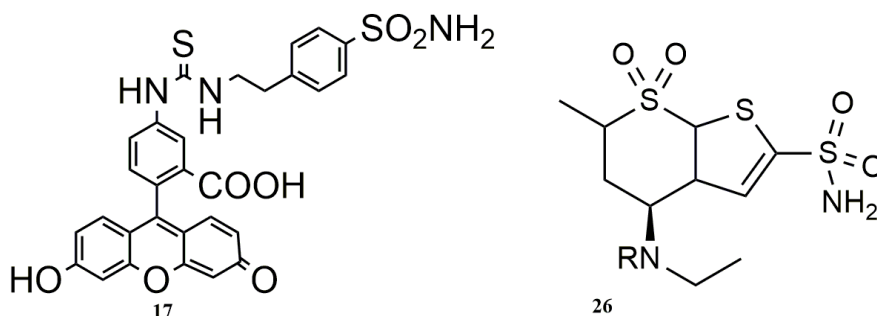
La bioriduzione nei tumori ipossici di tali solfonammidi dimeriche dovrebbe generare tioli, che quindi sono molto meno voluminosi e dovrebbero legarsi al sito attivo degli enzimi associati al cancro, presenti nei tumori ipossici.

### 3.3. INIBITORI DELLA ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI NELLA DIGNOSI DEL CANCRO <sup>[25]</sup>.

Essendo, le CAs IX e XII, espresse nelle cellule cancerose, potrebbero essere utilizzate come *marker* per una vasta gamma di tumori ipossici. Quindi alcune solfonammidi fluorescenti sono state progettate per l'*imaging* e la successiva diagnosi di tumori ipossici. Uno dei più importanti composti sviluppati fino ad oggi è il derivato **17** (4-sulfamoilfeniletitioureido) fluoresceina, preparato attraverso la reazione della fluoresceina tiocianato (FITC) con una omosulfanilammide aromatica ammino sostituita. E' stato dimostrato che il composto **17** lega solo il tessuto tumorale ipossico, sovraesprimendo gli isoenzimi associati al cancro, quindi è molto utile per evidenziare l'*imaging* di questo tipo di cancro.

Questo composto presenta una  $K_i$  verso la CA IX di 24 nM e mostra proprietà di impermeabilità alla membrana, valutata attraverso un modello *in vivo* delle membrane delle cellule rosse del sangue.

Per quanto riguarda il composto **26**, questo è stato capace di ridurre l'acidificazione extracellulare delle cellule CA IX del rene canino Madin-Darby (MDCK-CA IX) nell'ipossia, ed il loro effetto sul pH extracellulare normossico è risultato trascurabile. Attualmente, è stato sviluppato come strumento diagnostico, negli studi clinici, per l'*imaging* di tumori ipossici.



### 3.4. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI COME DIURETICI.

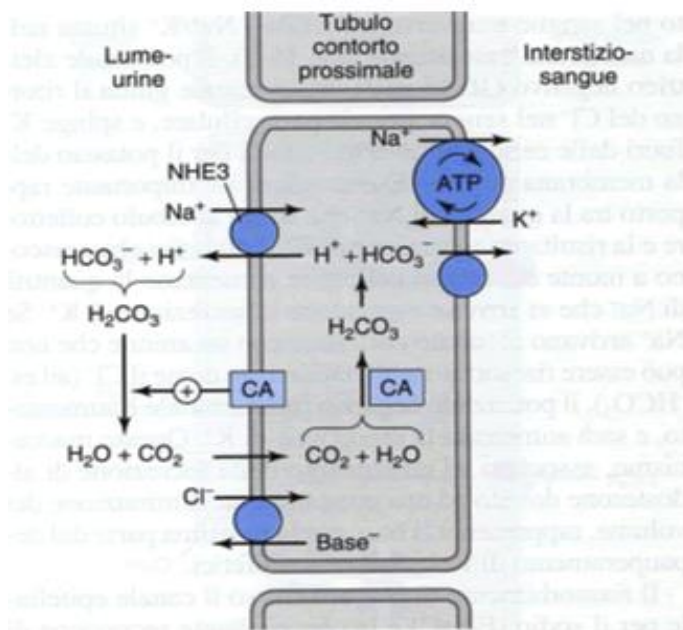
I farmaci diuretici incrementano il volume delle urine, attraverso la riduzione, più o meno spinta, del riassorbimento di sodio ed acqua in vari livelli del nefrone. Hanno proprietà antiipertensive, riducono la volemia e la pressione sanguigna.

I diuretici si dividono in varie classi:

- Diuretici drastici
- Risparmiatori di potassio
- Inibitori dell'anidrasi carbonica
- Diuretici triazidici

Le anidrasi carboniche sono presenti in maniera abbondante a livello dei reni e le isoforme presenti in questo organo giocano un ruolo cruciale in almeno tre processi fisiologici (**Figura 10**):

- Il bilancio omeostatico acido-base (con la secrezione e l'escrezione di protoni, che si formano dalla reazione di idratazione della  $\text{CO}_2$  catalizzata da questi enzimi)
- Il processo di riassorbimento del bicarbonato
- L'escrezione di  $\text{NH}_4^+$ .



**Figura 10.** Ruolo della CA nel rene.

L'acetazolamide (**1**) è stato il primo diuretico non-mercuriale ad essere utilizzato clinicamente nel 1956 <sup>[12]</sup>.

Tale composto rappresenta il prototipo di una classe di agenti farmacologici con uso terapeutico limitato, ma che ha un importante ruolo nello sviluppo delle basi della fisiologia



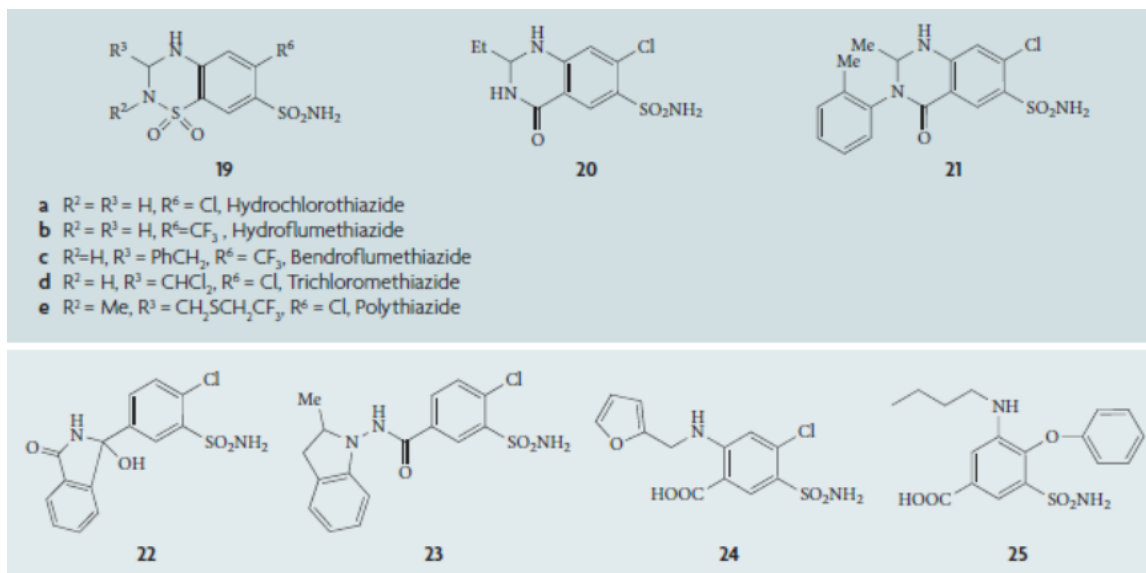
e farmacologia renale. Inoltre ha un ruolo predominante nella progettazione della maggior parte degli agenti diuretici attualmente usati, come la tiazide ed i diuretici high-ceiling.

L'inibizione dell'anidrasi carbonica comporta una diminuzione dello scambio tra ioni idrogeno e ioni sodio nel tubulo renale. Gli ioni sodio, insieme a ioni bicarbonato e ioni potassio, vengono escreti con conseguente effetto diuretico.

Quindi la somministrazione prolungata degli inibitori dell'anidrasi carbonica, come l'acetazolamide, provoca un aumento del volume delle urine che diventano più alcaline.

L'inibizione dell'anidrasi carbonica a livello del tubulo prossimale, porta all'inibizione della secrezione di  $H^+$  in questo segmento del nefrone. L'inibizione degli enzimi citosolici (CA II) e di membrana (CA IV, XII e XIV) sembra essere coinvolta negli effetti diuretici delle solfonammidi. Il risultato finale è un aumento della diuresi.

Molti altri diuretici, come le benzotiadiazine (**19 a-e**; per esempio la clorotiazide e l'idroclorotiazide); quinetazone (**20**); metolazone (**21**); clortalidone (**22**); indapamide (**23**); furosemide (**24**) e bumetanide (**25**) agiscono come inibitori dell'anidrasi carbonica con differente efficacia (**Figura 11**). Molti di essi hanno solfonammidi primarie non sostituite come gruppi che legano lo zinco <sup>[34]</sup>.



**Figura 11.** Diuretici inibitori della CA.

### 3.5. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI NEL TRATTAMENTO DELL'OSTEOPOROSI.

L'isoforma CA II altamente attiva è molto abbondante nelle ossa ed è presente solo a livello degli osteoclasti a concentrazioni dello stesso ordine di grandezza di quello presente a livello dei reni.

Il ruolo di questo enzima è quello di fornire ioni idrogeno, provenienti dall'idratazione della CO<sub>2</sub>, ad una pompa protonica ATP-dipendente, la quale li utilizza nella mobilitazione del calcio dalle ossa. Queste attività sono richieste per la dissoluzione della matrice inorganica, che precede la rimozione enzimatica della matrice organica dalle ossa. Per valutare il ruolo fisiologico delle anidrasi carboniche di membrana negli osteoclasti, sono stati usati nuovi inibitori della CA, strutturalmente correlati al composto **18**, che non permeano la membrana <sup>[35]</sup>.

In una coltura di osteoclasti di ratti, che sono stati esposti ad una bassa concentrazione di inibitore, è stato osservato un aumentato numero di osteoclasti ed un'attività di riassorbimento osseo. Il trattamento con gli inibitori disturba anche l'acidificazione intracellulare degli osteoclasti.

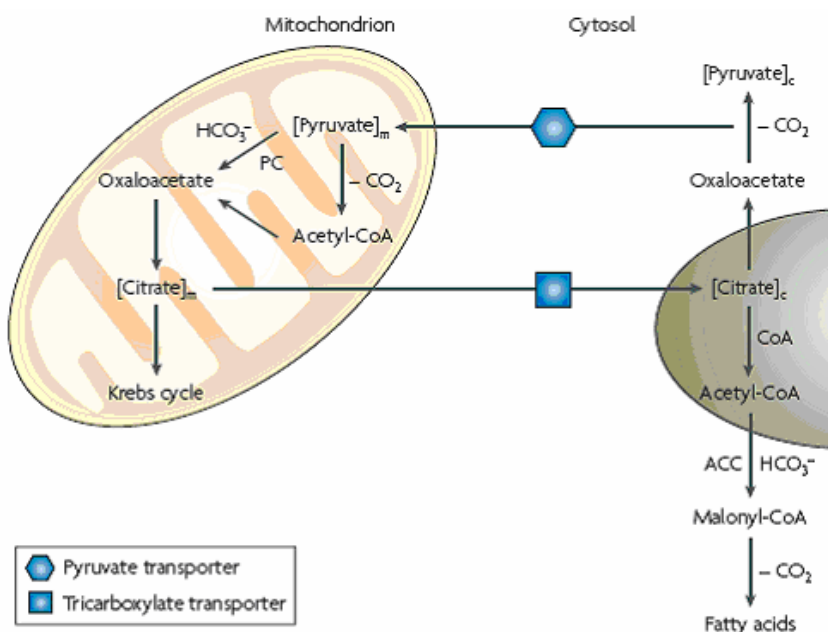
Gli isoenzimi di membrana CAIV e CA XIV sono espressi negli osteoclasti *in vivo* e *in vitro*. Successivi esperimenti sugli inibitori hanno fornito nuove evidenze che annullano l'ipotesi che la regolazione del pH intracellulare negli osteoclasti può coinvolgere il trasporto di metaboloni e che potrebbe essere possibile l'utilizzo di alcuni inibitori nella progettazione di nuove terapie anti-osteoporosi <sup>[35]</sup>.

### 3.6. INIBITORI DELL'ANIDRASI CARBONICA UTILIZZATI COME POTENZIALI FARMACI ANTI-OBESITÀ.

Tra le isoforme  $\alpha$ -CA trovate negli animali, gli isoenzimi CA VA e VB, sono presenti nei mitocondri (**Tabella 3**).

Questi isoenzimi sono coinvolti in differenti processi biosintetici, come l'ureogenesi, la gluconeogenesi e la lipogenesi nei vertebrati (per esempio nei roditori) e negli invertebrati (per esempio nelle cavallette) [36].

L'approvvigionamento di sufficiente bicarbonato (che rappresenta il substrato) in diversi processi biosintetici che coinvolgono la piruvato carbossilasi (PC), l'acetil-Co-A carbossilasi (ACC) e la carbamoil-fosfato sintetasi I e II, viene assicurato principalmente dalla reazione catalitica che coinvolge gli isoenzimi mitocondriali CA VA e CA VB, probabilmente aiutati dall'elevata attività dell'isoenzima citosolico CA II (**Figura 12**) <sup>[36]</sup>.



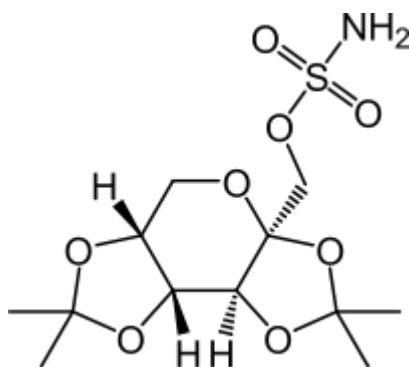
**Figura 12.** Sintesi del substrato, il bicarbonato, a livello mitocondriale.

Diversi studi hanno evidenziato che gli inibitori delle anidrasi carboniche hanno un potenziale come farmaci anti-obesità, che può essere dovuto ai loro effetti sugli isoenzimi CA.

Il topiramato (**9**) è un farmaco anti-epilettico che possiede potenti effetti anticonvulsivanti con un meccanismo d'azione multifattoriale: il blocco dei canali al sodio e dei recettori cainato/AMPA (acido  $\alpha$ -ammino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo-propionico), la ritenzione di  $\text{CO}_2$  secondaria all'inibizione dei globuli rossi del sangue e degli isoenzimi CA del cervello, come l'aumento del sistema di trasmissione GABA A (acido- $\gamma$ -ammino-butirrico) -ergico <sup>[37]</sup>. Un effetto collaterale di questo farmaco, osservato in pazienti obesi, era la perdita di peso corporeo, anche se nessuna spiegazione farmacologica di tale fenomeno è stata fornita <sup>[38]</sup>. Il topiramato ha inoltre dimostrato di ridurre le calorie e i grassi nei ratti obesi e in ratti Zucker.

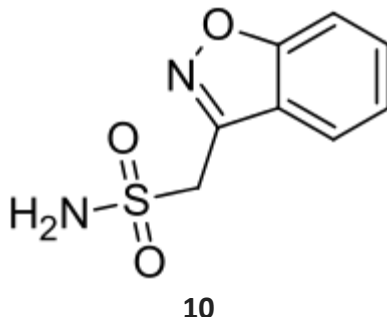
È stato anche dimostrato che il topiramato è un potente inibitore di differenti isoenzimi CA, come la II, VA, VB, VI, VII, XII e XIII (**Tabella 4**), ed è stata determinata la struttura cristallina a raggi X del suo complesso con la CA II umana, rivelando le interazioni molecolari che spiegano l'elevata affinità di questo composto per il sito attivo della CA <sup>[37]</sup>.

Poiché il topiramato agisce anche come efficace inibitore degli isoenzimi CA VA e VB mitocondriali umani, l'inibizione di entrambi gli isoenzimi CA mitocondriali e citosolici coinvolti nella lipogenesi, può costituire un nuovo approccio per controllare la perdita di peso <sup>[36,38]</sup>.



9

La zonisamide (**10**) è un altro farmaco anti-epilettico usato come terapia aggiuntiva nei parziali attacchi refrattari. Tale composto ha molteplici meccanismi d'azione e mostra un ampio spettro d'azione nell'attività anticonvulsivante.



Analogamente al topiramato (**9**), recenti studi clinici hanno dimostrato un potenziale utilizzo terapeutico della zonisamide (**10**) nel dolore neuropatico, nei disturbi bipolari, nell'emicrania, nell'obesità, nelle malattie legate al cibo e nel morbo di Parkinson.

La zonisamide (**10**) è una solfonammide alifatica, che inibisce in maniera potente le anidrasi carboniche citosoliche e mitocondriali coinvolte nella lipogenesi (**Tabella 4**). Inoltre, in associazione con una dieta povera di calorie (deficit di 500 Kcal per giorno), permette di ottenere una riduzione del peso medio di 5 Kg, confrontato con una sola dieta effettuata da pazienti obese di sesso femminile <sup>[39]</sup>.

Sia il topiramato (**9**) che la zonisamide (**10**) determinano una perdita di peso dovuta all'inibizione della lipogenesi, mediata da questi due agenti, che a loro volta è mediata dall'inibizione di alcuni isoenzimi CA coinvolti nella carbossilazione del piruvato ad ossaloacetato (isoforme mitocondriali CA VA e VB) e dell'acetil-coenzima-A a malonil-coenzima-A (isoforma citosolica CA II).

L'effetto globale è una potente inibizione della lipogenesi.

Attualmente una combinazione del topiramato (**9**) con la fentermina, Qnexa, è in fase III di sperimentazione clinica per il trattamento dell'obesità, che lo inserisce in una prima classe di farmaci, con un nuovo meccanismo d'azione.

L'inibizione delle isoforme mitocondriali CA VA e CA VB, probabilmente in associazione con l'inibizione delle isoforme citosoliche CA II che sono ubiquitarie, può presentare un passo ulteriore verso la progettazione di nuovi farmaci anti-obesità che riducono la lipogenesi inibendo le anidrasi carboniche <sup>[36]</sup>.

*Introduzione*

*Parte sperimentale*

Le anidrase carboniche sono una superfamiglia di metallo-enzimi che catalizzano l'interconversione tra  $\text{CO}_2$  e ione bicarbonato. Sono quindi coinvolte in un cruciale processo fisiologico connesso alla respirazione e al trasporto di  $\text{CO}_2$ /bicarbonato attraverso i tessuti metabolizzanti ed i polmoni.

Ad oggi sono conosciute cinque distinte famiglie genetiche di diversa evoluzione:  $\alpha$ -CA,  $\beta$ -CA,  $\gamma$ -CA,  $\delta$ -CA,  $\zeta$ -CA. Nei vertebrati più sviluppati, compresi gli esseri umani, sono stati scoperti quattordici isoenzimi delle  $\alpha$ -CA, numerati da I a XIV. Recentemente è stato individuato un ulteriore isoenzima delle  $\alpha$ -CA (CA XV), presente in diverse specie animali, eccetto che negli esseri umani e negli scimpanzé. Le diverse famiglie di anidrase carboniche differiscono per lo ione metallico presente nel sito attivo.

Tutte e cinque le classi di enzimi sono zinco-enzimi, ma probabilmente le  $\gamma$ -CAs sono ferro-enzimi, anche se sono comunque attive anche in presenza degli ioni zinco o cobalto<sup>[39,40]</sup>, mentre le  $\zeta$ -CAs utilizzano cadmio o zinco per la catalisi delle reazioni fisiologiche<sup>[41,42]</sup>.

Gli isoenzimi CA svolgono varie importanti funzioni fisiologiche e fisiopatologiche relative alla respirazione e al trasporto di  $\text{CO}_2$ /bicarbonato; inoltre regolano il pH e l'omeostasi della  $\text{CO}_2$ , la secrezione di elettroliti in una varietà di tessuti e organi, le reazioni di biosintesi (come la gluconeogenesi, la lipogenesi e l'urogenesi), il riassorbimento osseo e la calcificazione. Recentemente è stato evidenziato che sono anche coinvolte in alcuni processi patologici (tumorigenicità, obesità, epilessia, crescita e virulenza di vari patogeni).

Le anidrase carboniche sono enzimi ubiquitari, quindi la loro presenza in così tanti tessuti e in così tante isoforme rappresenta una meta attraente per la progettazione di inibitori con diverse applicazioni biomediche.

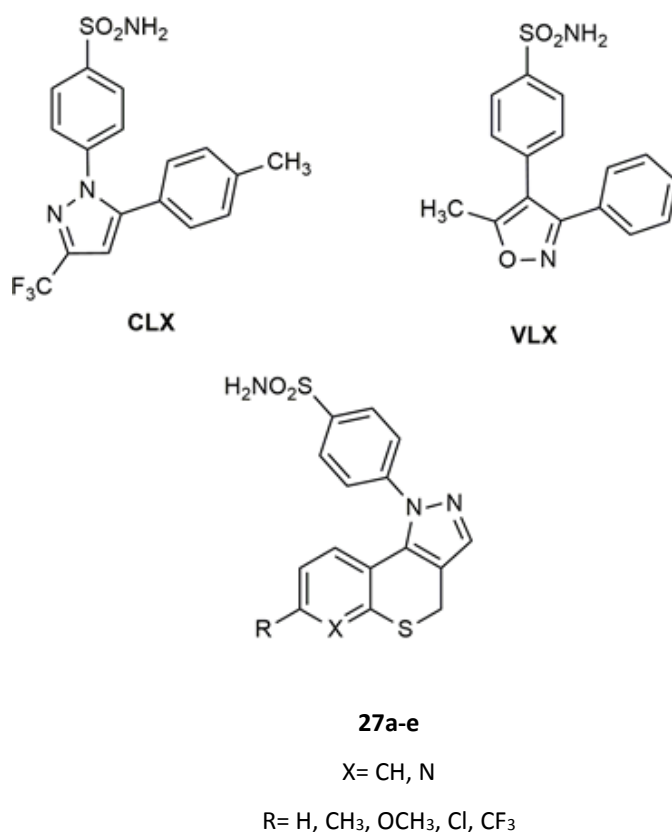
Molti inibitori delle anidrase carboniche (CAI) sono risultati essere agenti efficaci dal punto di vista clinico e negli ultimi anni sono emerse nuove applicazioni dei CAI. Essi possono essere utilizzati quali farmaci antiglaucoma, diuretici, anticonvulsivanti, antiobesità, antipánico ed anche agenti antitumorali o strumenti diagnostici<sup>[43-49]</sup>. Di conseguenza sono state sviluppate numerose classi di CAI al fine di modularne le proprietà farmacologiche.

Le anidrase carboniche vengono inibite principalmente da due classi di composti: gli anioni complessanti il metallo (tra cui molti carbossilati) e le

solfonammidi/sulfamati/sulfammidi, che generalmente si legano allo ione  $\text{Zn}^{2+}$  del sito attivo dell'enzima.

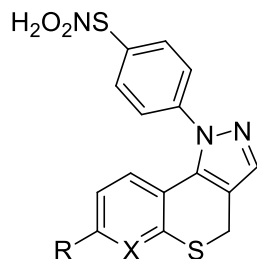
L'inibizione delle CA non ha solo le applicazioni farmacologiche viste, ma è anche un target emergente nella progettazione di anti-infettivi (agenti antimicotici e antibatterici) [50-52] con un diverso meccanismo d'azione.

Sulla base di quanto detto, il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia tesi ha recentemente descritto nuovi derivati triciclici contenenti lo scaffold benzotipiranopirazolico e piridotipiranopirazolico sul quale è stata inserita una funzione benzensolfonammidica **27a-e** [53]. Questi composti erano stati progettati quali analoghi rigidi di Celecoxib e Valdecoxib, che nati come inibitori specifici delle ciclossigenasi 2 (COX-2), hanno dimostrato di essere anche potenti inibitori delle CAs [54-56].





I composti **27a-e**, così come i composti di riferimento **CLX** e **VLX** sono stati saggiati quali inibitori catalitici delle isoforme hCA I-XIV (**Tabella 5**) presso il laboratorio del Professor Supuran, C. T. dell'Università di Firenze.



**27a-e**

**27a:** X = CH    R = OCH<sub>3</sub>  
**27b:** X = CH    R = Cl  
**27c:** X = CH    R = CF<sub>3</sub>  
**27d:** X = N     R = H  
**27e:** X = N     R = CH<sub>3</sub>

**Tabella 5:** Inibizione di hCA isoforme I-XIV con i composti **27a-e**, Celecoxib (CLX) e Valdecoxib (VLX).

	K <sub>i</sub> (nM) <sup>α</sup>						
Enzyme	27a	27b	27c	27d	27e	CLX	VLX
<b>hCA I</b>	65	212	318	193	155	50000	54000
<b>hCA II</b>	16	29	210	72	49	21	43
<b>hCA III</b>	22700	32000	28600	6400	7900	7400	78000
<b>hCA IV</b>	8850	7200	7140	328	7500	880	1340
<b>hCA VA</b>	923	440	327	476	992	794	912
<b>hCA VB</b>	1072	3140	3250	3180	3270	93	88
<b>hCA VI</b>	7116	9280	9340	8055	8140	94	572
<b>hCA VII</b>	609	602	628	873	912	2170	3900
<b>hCA IX</b>	2182	1845	2570	2340	3250	16	27
<b>hCA XII</b>	4550	5620	6755	5540	5870	18	13
<b>hCAXIII</b>	938	2810	714	4300	4630	98	425
<b>hCA XIV</b>	931	797	548	715	844	689	107

<sup>α</sup>: media di tre diversi saggi. Gli errori sono nel range di ± 10 dei valori riportati (dati non mostrati).

La caratteristica principale dei derivati **27a-e** è l'elevata inibizione dell'anidrasi carbonica umana (hCA) I e II, mentre la loro attività inibitoria verso hCA III, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII e XIV è risultata di due ordini di grandezza più bassa.

Dall'analisi della **Tabella 5** sono emerse le seguenti relazioni struttura-attività (SAR)<sup>[53]</sup>:

- Le isoforme citosoliche hCA I e II sono inibite rispettivamente moderatamente ed efficacemente dai composti **27a-e**. Il profilo di inibizione di questi composti nei confronti di hCA II è risultato simile a quello di Celecoxib e Valdecoxib (**Tabella 5**), mentre nei confronti di hCA I è risultato migliore.

La presenza nello scaffold eterociclico di un benzene o di una piridina porta comunque all'ottenimento di efficaci CAI. Inoltre, nell'ambito dei derivati benzotioipiranicici, gli inibitori più efficaci sono stati quelli recanti il gruppo metossilico (**27a**) o un atomo di cloro (**27b**) in posizione 7, mentre l'introduzione di un gruppo CF<sub>3</sub> (**27c**) ha comportato una minore attività inibitoria nei confronti di entrambe le isoforme.

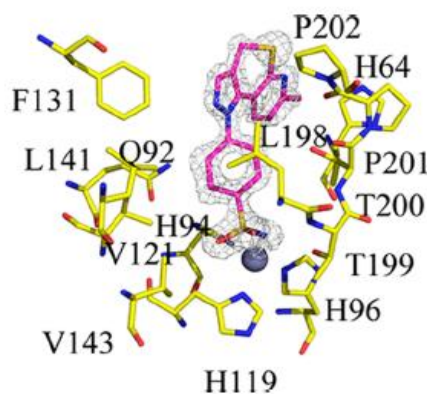
- L'isoforma citosolica lenta hCA III viene inibita poco sia dai composti **27a-e**, che da celecoxib e valdecoxib. Ciò è probabilmente dovuto ad una specifica struttura del sito attivo dell'enzima hCA III, il quale presenta un ingombrante residuo di Fenilalanina (Phe198) al centro della tasca attiva che interferisce con il legame dei composti **27a-e**, stericamente ingombranti <sup>[52]</sup>.
- L'isoforma IV di membrana viene inibita moderatamente dai composti **27a-e**. Il composto con un profilo migliore di inibizione rispetto a questa isoforma, è **27d**, che presenta l'anello pirimidinico non sostituito (R = H).
- Le isoforme mitocondriali hCA VA e VB, nonché l'isoforma hCA VI secreta nella saliva, sono inibite da questi composti e dai coxib, con costanti di inibizione nell'intervallo 327-9340 nM.
- Le isoforme citosoliche rimanenti hCA VII e hCA XIII sono inibite moderatamente dai composti **27a-e**. I derivati piridinici **27d-e** hanno mostrato un'attività inibitoria inferiore nei confronti dell'isoforma hCA VII. Sembra che per questa isoforma la natura del sostituito R abbia minor influenza sull'attività inibitoria. Al contrario,

per l'inibizione dell'isoforma hCA XIII questo sembra essere il parametro più importante. Infatti il composto **27c** ( $R = CF_3$ ) mostra i migliori profili di inibizione.

Importante sottolineare che i coxib, VLX e CLX, sono inibitori deboli di hCA VII, ma mostrano un miglior profilo di inibizione nei confronti di hCA XIII.

- Le isoforme transmembranarie hCA IX, XII e XIV sono inibite moderatamente dai nuovi composti **27a-e**. L'isoforma maggiormente inibita è hCA XIV, mentre l'isoforma meno inibita è hCA XII.

La cristallografia a raggi X e studi di sovrapposizione hanno permesso di spiegare il profilo di inibizione specifico delle pirazolo-solfonammidi, che è risultato piuttosto differente da quello dei composti di riferimento CLX e VLX. In particolare, per analizzare il tipo di inibizione ottenuta con questi derivati sono stati condotti studi di cristallografia a raggi X del composto **27e** complessato con l'enzima hCA II (**Figura 13**).



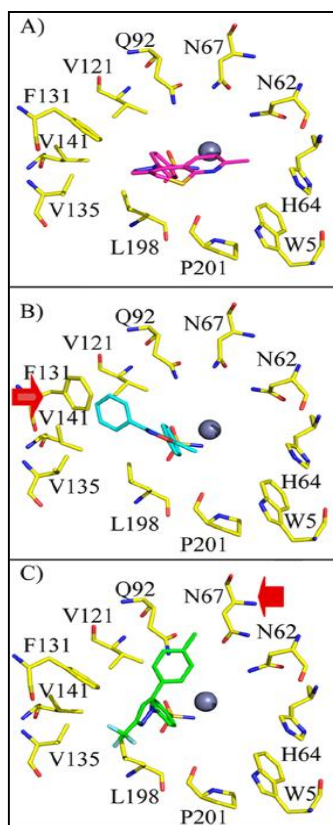
**Figura 13.** Rappresentazione del sito attivo dell'enzima hCA II complessato con il composto **27e** (rosa). Lo ione zinco nel sito attivo è rappresentato come una sfera grigia.

Da questo studio è risultato che il composto **27e** si inserisce profondamente nel sito attivo dell'enzima, spiazzando il solvente legato allo zinco catalitico, per cui l'azoto della solfonammide si lega direttamente allo ione zinco. L'azoto e l'ossigeno della solfonammide si trovano infatti ad una giusta distanza per formare legami a idrogeno con la Treonina 199 (**Figura 13**).

L'atomo di zolfo distorce l'anello tiopiranic, ma non è direttamente coinvolto nell'interazione con l'enzima hCA II. Gli anelli idrofobici del sistema eterociclico si

protendono all'esterno e sono stabilizzati principalmente da residui idrofobici che delimitano la cavità del sito attivo, coinvolgendo interazioni di Van der Waals con le catene laterali di Valina 121, Fenilalanina 131, Leucina 198, Prolina 202 ed Istidina 64.

In **Figura 14** è riportata la sovrapposizione della struttura hCA II-**27e** (**Figura 14A**) che è stata effettuata parallelamente con quella di VLX (**Figura 14B**) e CLX (**Figura 14C**).



**Figura 14.** *Rappresentazione dei composti **27e** (A, rosa), di VLX (B, ciano) e di CLX (C, verde) sovrapposti sul sito attivo della hCA II. Gli amminoacidi sono rappresentati come bastoncini gialli, mentre lo ione zinco nel sito attivo è rappresentato come una sfera grigia. Le frecce rosse indicano il cambiamento conformazionale di hCA II nel legame con l'inibitore.*

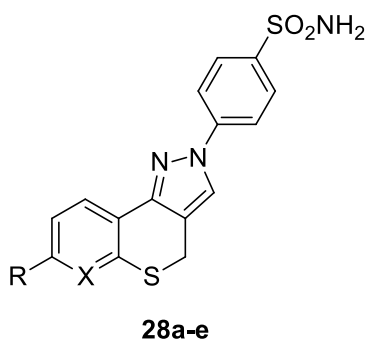
L'aspetto più interessante di questa comparazione ha rivelato che tutti e tre i composti si legano allo ione zinco del sito attivo e che i loro gruppi terminali hanno la capacità di occupare zone diverse sulla superficie del sito attivo. In particolare, l'anello fenilico idrofobico di VLX spinge fuori la Fenilalanina 131 dalla tasca idrofobica a differenza dei composti **27e** (**Figura 14a**) e CLX (**Figura 14B**). L'anello fenilico idrofobico di CLX costringe l'Asparagina 67 a cambiare conformazione (**Figura 14C**), inoltre CLX ha sia una regione

idrofila ricca di fluoro che un anello fenilico idrofobico, ciò gli conferisce un orientamento insolito. Per quanto riguarda il composto **27e**, l'atomo di azoto idrofilo fuso nell'anello piridinico, può essere coinvolto nel legame a idrogeno con il solvente e quindi non necessita della presenza nella tasca idrofobica della Fenilalanina 131 (**Figura 14A**).

Nonostante i cambiamenti conformazionali delle catene laterali dei tre inibitori (**27e**, VLX e CLX) che interagiscono con hCA II e i loro diversi orientamenti all'interno del sito attivo, tutti e tre interagiscono con circa le stesse dimensioni superficiali della proteina, che è rispettivamente: 407, 451 e 409 Å<sup>2</sup> [53].

I risultati ottenuti hanno indicato che le benzensolfonammidi **27a-e** costituiscono una nuova classe di inibitori delle anidrasi carboniche altamente interessante, in quanto presentano specificità nei confronti di un numero ristretto di isoforme CA.

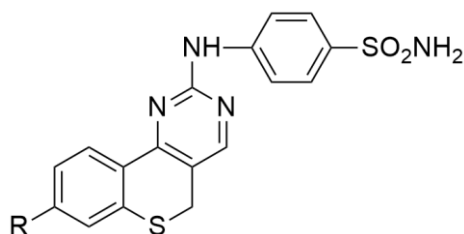
Lo sviluppo di questo studio allo spostamento della porzione benzen-solfonammidica dalla posizione 1 alla posizione 2 del nucleo pirazolico (composti di formula generale **28**).



- 28a:** X = CH    R = OCH<sub>3</sub>  
**28b:** X = CH    R = Cl  
**28c:** X = CH    R = CF<sub>3</sub>  
**28d:** X = N     R = H  
**28e:** X = N     R = CH<sub>3</sub>

La sintesi dei derivati **28a-e** è già stata effettuata in una precedente tesi ed i composti ottenuti sono stati inviati a screening farmacologico presso il laboratorio del Professor Supuran.

In seguito è stata possibile la modifica dello scaffold, in particolare sono stati progettati gli omologhi superiori contenenti il nucleo pirimidinico. Questo ha permesso di introdurre la porzione benzen-solfonammidica in posizione 2 dell'anello pirimidinico.



**29a-c**

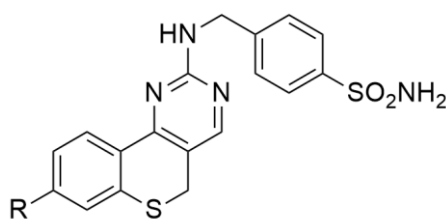
**29a:** R = H

**29b:** R = Cl

**29c:** R = OCH<sub>3</sub>

Anche la sintesi dei derivati **29a-c** è già descritta in una precedente tesi ed i composti ottenuti sono stati inviati anche essi a screening farmacologico presso il laboratorio del professor Supuran.

Lo scopo della mia tesi è stato quello di sintetizzare gli analoghi benzotioipiranopirimidinici, nella cui posizione 2 dell'anello pirimidinico è stata inserita una funzione benzilsolfonammidica,



**30 a-c**

**30a:** R = H

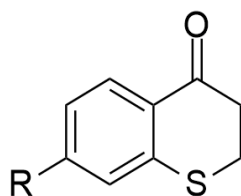
**30b:** R = Cl

**30c:** R = OCH<sub>3</sub>

Il razionale della sintesi di questi composti risiede nel valutare se la funzione benzen-solfonammidica, deve essere in un opportuna posizione dello scaffold per mantenere una certa selettività per una particolare isoforma dell'anidrasi carbonica o se può essere libera di ruotare.

Ed inoltre è importante valutare, se questa maggiore flessibilità data dalla porzione benzil-solfonammidica, possa essere utile per un migliore adattamento alla tasca cataliticamente attiva dell'enzima.

La sintesi dei nuovi composti **30a-c** è stata progettata, come per le precedenti benzotipiranopirimidine a partire dai corrispondenti benzotipiranoni **31a-c**



**31a-c**

**31a:** R = H

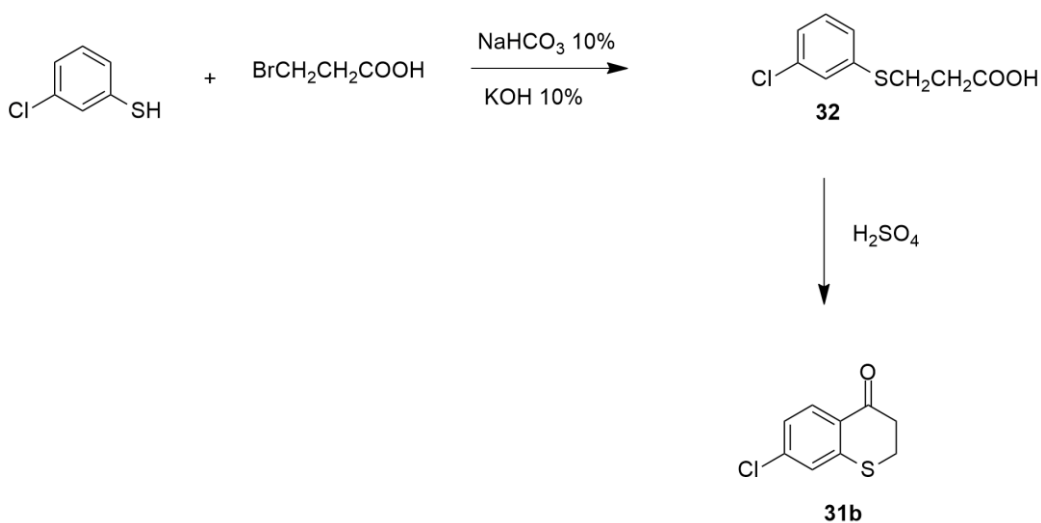
**31b:** R = Cl

**31c:** R = OCH<sub>3</sub>

In particolare, per la sintesi del derivato non sostituito in posizione 7 (**30a**), è stato utilizzato come prodotto di partenza il benzotipiranone (**31a**) commercialmente disponibile, mentre per la sintesi dei derivati 7 sostituiti (**30b e 30c**) è stato necessario preparare i corrispondenti benzotipiranoni 7-sostituiti (**31b e 31c**) come già descritto in letteratura [59]

In particolare il 7-Clorobenzotipiranone è stato sintetizzato come riportato nello **schema 1**.

### Schema 1

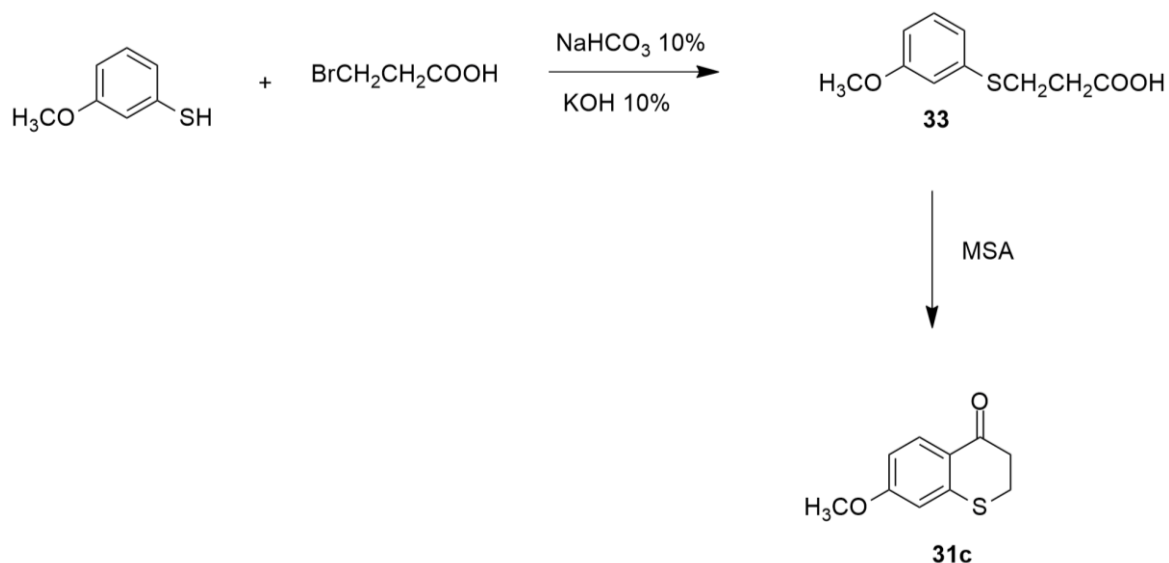


Una soluzione di acido 3-bromopropionico in  $\text{NaHCO}_3$  al 10% è addizionata ad una soluzione di 3-clorotiofenolo in  $\text{NaOH}$  al 10%.

La miscela di reazione è lasciata a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente a riflusso per 3 ore. La soluzione ottenuta, dopo raffreddamento, è acidificata con acido cloridrico concentrato fino a pH 4. Il solido bianco, precipitato è raccolto mediante filtrazione per ottenere il corrispondente acido tiopropionico puro **32**, che per trattamento con acido solforico concentrato, a temperatura ambiente per 5 ore, è ciclizzato a dare il 7-cloro-2,3-diidro-1-benzotiopiran-4(4H)one **31b**, purificato tramite cristallizzazione da etere di petrolio 40-60 °C.



In maniera analoga è stato sintetizzato il 7-metossi-benzotipiranone **31c**, (**Schema 2**).



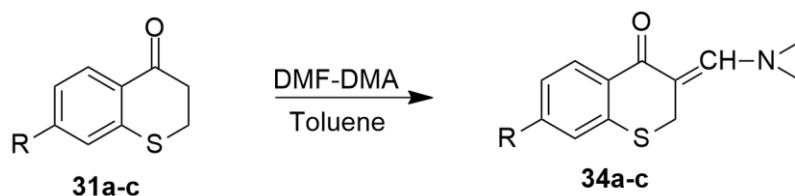
Una soluzione di acido 3-bromopropionico  $\text{NaHCO}_3$  al 10% è stata aggiunta ad una soluzione di 3-metossitiofenolo in  $\text{NaOH}$  al 10%. La miscela di reazione è lasciata a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente a riflusso per 3 ore. La soluzione ottenuta, dopo raffreddamento, è acidificata con acido cloridrico concentrato fino a pH 4. Il solido precipitato è stato raccolto mediante filtrazione per ottenere il corrispondente acido tiopropionico puro **33**, che viene addizionato di acido Metansolfonico (MSA), e la miscela di reazione viene riscaldata a  $75^\circ\text{C}$  per 2 ore. Dopo raffreddamento, la soluzione ottenuta è versata in ghiaccio ed estratta con  $\text{AcOEt}$ . La fase organica è seccata su  $\text{MgSO}_4$ , filtrata ed evaporata a pressione ridotta, ottenendo il 7-metossi-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)one **31c** che viene purificato mediante cromatografia flash utilizzando come miscela eluente: Esano/  $\text{AcOEt}$  7:3 (**Schema 2**).

Il tiocroman-4-one **31a**, il 7-cloro-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)-one **31b** ed il 7-metossi-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)-one **31c** hanno rappresentato gli intermedi chiave per la preparazione dei nuovi derivati benzotipirano-pirimidinici **30a-c**

Generalmente, la procedura di sintesi che porta al sistema pirimidinico sfrutta la reattività 1,3-bielettrofila degli intermedi 3-dimetilamminometilenici **34a-c** nella reazione con opportune amidine binucleofile (o opportune guanidine) in ambiente basico. <sup>[60]</sup>

La preparazione dei derivati **34a-c**, è stata effettuata con buone rese, a partire dai tiopiranoni **31a-c**, per reazione con un eccesso di dimetilformammide dimetilacetale (DMF DMA) in toluene a riflusso. <sup>[61-62]</sup> (**schema 3**).

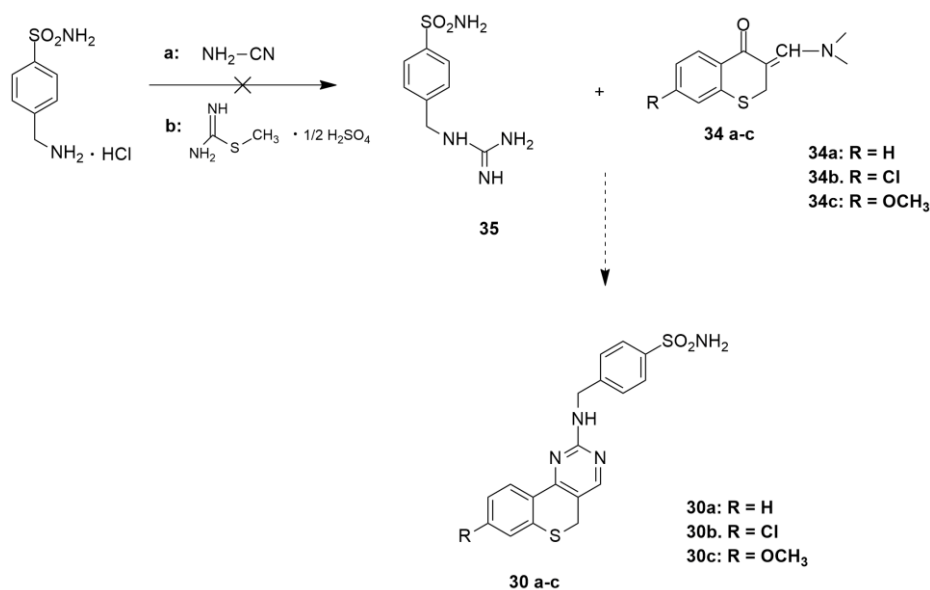
**Schema 3**



**31a,34a** : R = H  
**31b,34b** : R = Cl  
**31c,34c** : R = OCH<sub>3</sub>

Quindi la sintesi dei nuovi derivati benzotiopiranopirimidinici benzensolfonammido sostituiti **30a-c** prevedeva come primo step la sintesi della p-solfonammido benzilguanidina **35** a partire dalla 4-amminometil-benzensolfonammide cloridrato, commercialmente disponibile, e successivamente la condensazione con i gli appropriati amminodimetilen derivati **30a-c**. La sintesi del composto **35** è stata tentata seguendo due differenti procedure (**schema 4**).

**Schema 4**



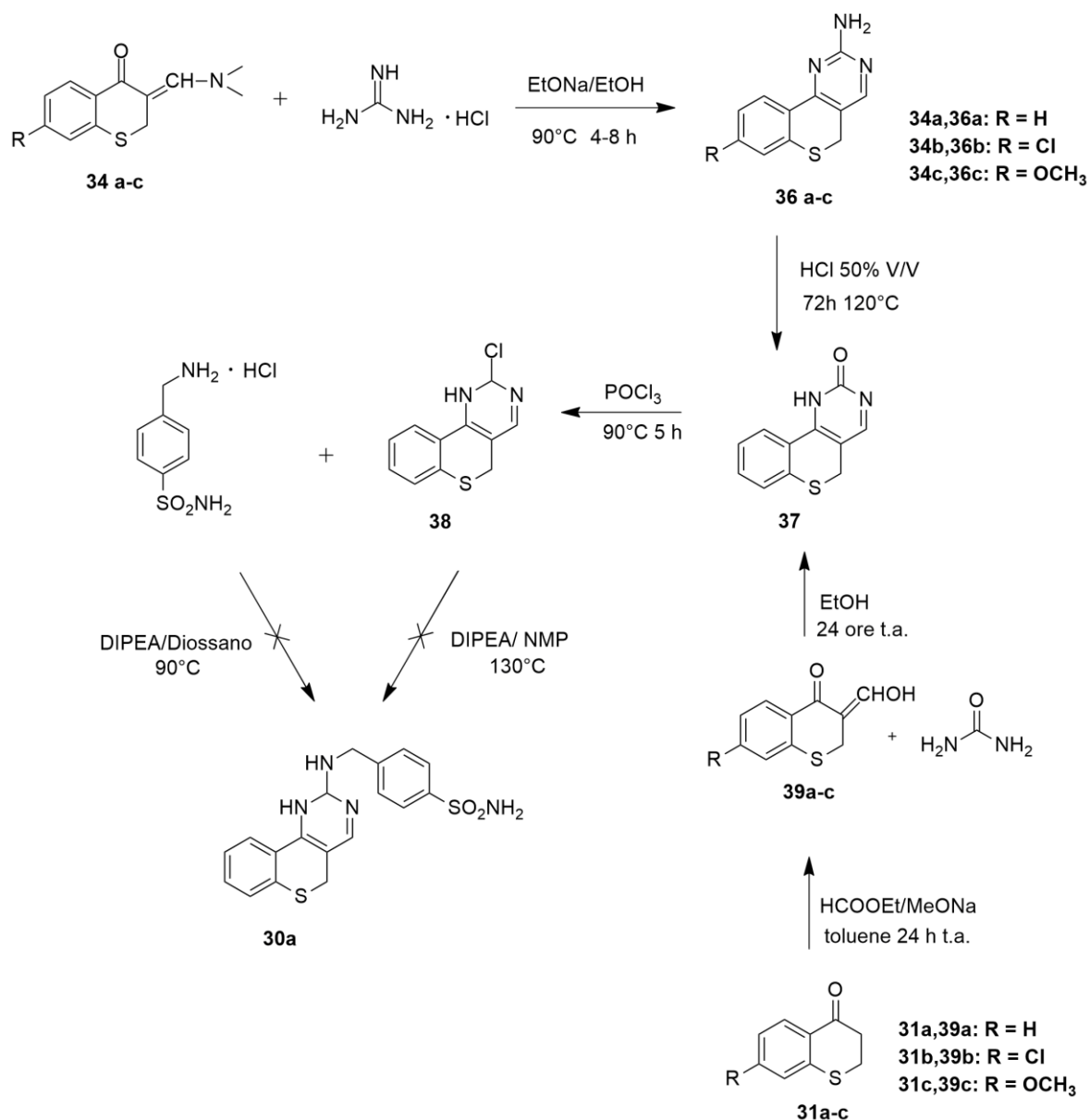
La prima procedura prevedeva la reazione tra la 4-amminometilbenzensolfonammide cloridrato e la cianammide (soluzione 50% acquosa) lasciando in agitazione a temperatura ambiente per circa 2-3 ore, come riportato in letteratura per l'ottenimento di fenilguanidine<sup>[63]</sup>. In questo modo si ottiene un composto di difficile purificazione, in quanto la guanidina si forma in piccolissime percentuali, ed è risultato perciò impossibile isolarla (la cianammide era comunque presente).

La seconda procedura prevedeva la reazione tra la 4-amino-metil-benzensolfonammide cloridrato e la metilpseudotiourea emisolfato in soluzione acquosa. Alla soluzione acquosa della metilpseudotiourea emisolfato è aggiunta la 4-amminometilbenzensolfonammide a 0° C e la miscela di reazione è scaldata a riflusso per 24 ore come riportato in letteratura per la sintesi di guanidine analoghe<sup>[60]</sup>. Anche in questo caso sono stati recuperati i prodotti di partenza non reagiti.

Si è pensato quindi di modificare leggermente la procedura sintetica per l'ottenimento delle guanidine **35** nella reazione con Metilpseudotiourea. Abbiamo cercato di liberare la base dal suo cloridrato nel composto commerciale per renderla maggiormente reattiva. A questo scopo è stata aggiunta una quantità in eccesso di  $\text{NH}_4\text{OH}$  alla miscela di reazione e la reazione è stata effettuata a 70°C per 16 ore. Dopo raffreddamento il solvente è rimosso a pressione ridotta. Dopo opportuno trattamento e successiva caratterizzazione tramite spettroscopia NMR, possiamo concludere di non aver ottenuto il composto desiderato.

In alternativa è stata progettata una via sintetica che prevedeva inizialmente l'ottenimento delle 2-amminopirimidine **36a-c** (**Schema 5**).<sup>[64-65]</sup>

## Schema 5



Le Pirimidine **36a-c** sono state ottenute per reazione tra gli opportuni derivati dimetilamminometilenici **34a-c** con la guanidina cloridrato in una miscela di EtONa/EtOH scaldando a riflusso per 4-8 ore. Successivamente la sospensione ottenuta viene filtrata, il precipitato ottenuto viene lavato con H<sub>2</sub>O, seccato su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> ed infine cristallizzato da etanolo a dare i derivati desiderati **36a-c**. [64-65]

Successivamente il derivato **36** è stato solubilizzato in HCl 50% v/v e scaldato a  $120^\circ\text{C}$  per 72h (a dare il composto **36**, sufficientemente puro da poter essere utilizzato per lo step

successivo) in cui è stato eliminato il solvente per evaporazione a pressione ridotta ed il residuo è stato trattato una soluzione di  $\text{POCl}_3$  per 5 ore a  $90^\circ\text{C}$ . Per raffreddamento si ottiene un precipitato corrispondente al prodotto grezzo **38** che viene filtrato e purificato mediante cromatografia flash su colonna utilizzando come miscela eluente AcOEt/etere di Petrolio = 8:2. <sup>[66]</sup>

Il composto **37** è stato ottenuto anche con una procedura alternativa e cioè a partire dall'idrossimetilenderivato **39a**. Questo è stato ottenuto per reazione tra il Tiocromanone **31a** e formiato di etile in MeONa/MeOH e Toluene mantenendo la miscela sotto agitazione per 24 ore. In maniera analoga sono stati sintetizzati i derivati **39b-c** <sup>[67-68]</sup> che però non sono stati utilizzati per la reazione successiva. L'alfa-idrossimetilenderivato **39a** che si ottiene è sufficientemente puro per essere utilizzato nella reazione successiva. Esso è stato solubilizzato in EtOH anidro e fatto reagire con l'Urea per 24 ore a temperatura ambiente. Il solvente viene quindi eliminato a pressione ridotta ed il prodotto viene purificato mediante cromatografia flash su colonna con miscela eluente Diclorometano/Metanolo = 98:2. <sup>[69]</sup>

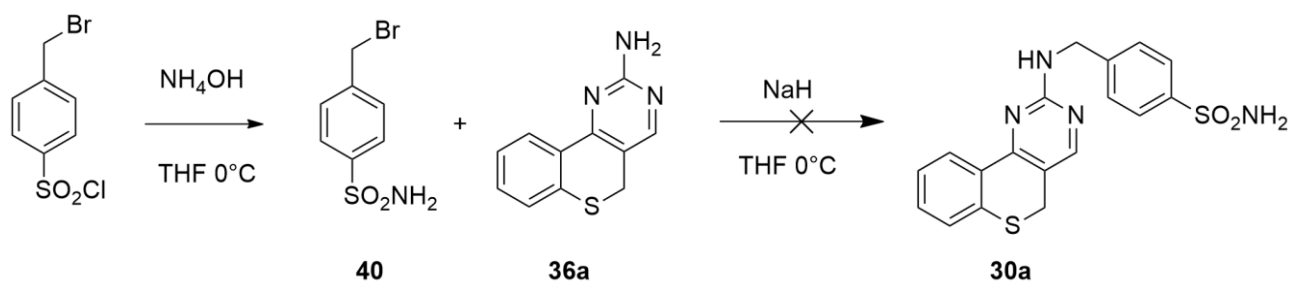
La sintesi del composto desiderato **30a** prevede la reazione tra il prodotto **38** e la 4-amminometilbenzensolfonammide cloridrato. La reazione è stata tentata utilizzando due diversi solventi. <sup>[70-71]</sup>

Il 2-Cloroderivato **38** è stato solubilizzato in diossano o in N-Metilpirrolidone (NMP) e alla soluzione è stata addizionata la Diisopropiletilammina (DIPEA) come base ed infine la 4-amminometilbenzensolfonammide cloridrato. La miscela di reazione è scaldata a  $90^\circ\text{C}$  (se il solvente è il diossano) o a  $120^\circ\text{C}$  (se il solvente è l'NMP) e si lascia in agitazione per 24 ore.

In ogni caso, dopo opportuno trattamento, sono stati recuperati i prodotti di partenza non reagiti.

Un'altra via di sintesi ideata per l'ottenimento dei prodotti **30a-c** è illustrata nello schema 6.

**Schema 6**



Il 4-bromometil-benzen-1-solfonil-cloruro viene fatto reagire con  $\text{NH}_4\text{OH}$  in bagno di ghiaccio a  $0^\circ\text{C}$  per 2 ore. La soluzione viene estratta con una miscela acqua/acetato. La fase organica viene essiccata su  $\text{MgSO}_4$  ed il solvente viene evaporato a pressione ridotta, ottenendo così l'intermedio **40** <sup>[73]</sup>. Esso viene fatto reagire con la 2-amminopirimidina **36a** per ottenere il composto desiderato **30a**. Una soluzione della 2-amminopirimidina in THF anidro è raffreddata a  $0^\circ\text{C}$  e vi viene addizionato  $\text{NaH}$ . Dopo 20 minuti viene aggiunto il composto **40** e si lascia, sotto continuazione agitazione, a temperatura ambiente per 24 ore <sup>[74]</sup>. Dopo opportuno trattamento e caratterizzazione tramite NMR del prodotto di reazione possiamo concludere che esso non è quello desiderato.

*Parte*

*Sperimentale*

## MATERIALI E METODI

Se non diversamente specificato, tutti i solventi ed i reagenti utilizzati per la sintesi sono stati acquistati dalle ditte fornitrici e sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione.

Come agente essiccante è stato utilizzato il solfato di magnesio.

L'evaporazione dei solventi è stata effettuata sottovuoto utilizzando l'evaporatore ruotante.

Le rese (%) si riferiscono a composti cromatograficamente e spettroscopicamente ( $^1\text{H}$ -NMR) omogenei.

Le reazioni sono state monitorate mediante cromatografia su strato sottile (T.L.C.) realizzate su foglio di alluminio ricoperto di silice (MERK 60 F-254, spessore 0.2 mm).

Per le colonne cromatografiche è stato utilizzato il gel di silice 60 (230-400 mesh).

Gli spettri di risonanza magnetica del protone ( $^1\text{H}$ -NMR) sono stati eseguiti in soluzione di cloroformio deuterato ( $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$ ), oppure in una soluzione di dimetilsolfossido esa-deuterato ( $\text{DMSO-d}_6$ ) con uno spettrometro Brucker-400 (400-MHz) utilizzando  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$  (TMS) come standard interno.

I punti di fusione sono stati determinati con un apparecchio di Reichert Köfler e non sono stati corretti.

I composti **31a-c,32,33,34a-c,36a-c,39a-c** sono stati già descritti nei precedenti lavori [59,60,61, 62].

### **Acido 3-[(3-clorofenil)tio]propionico **32**** <sup>[59]</sup>

Ad una soluzione di 3-clorotiofenolo (3.3 ml, 28.5 mmoli) in 12 ml di NaOH 10% si aggiunge una soluzione di acido 3-bromopropionico (4.580 g, 36.5 mmoli) in 28 ml di  $\text{NaHCO}_3$  al 10%. La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore e successivamente a riflusso per 3 ore. La miscela di reazione viene acidificata con HCl conc. fino a pH 4. Si forma un solido bianco che viene raccolto per filtrazione.

*Acido 3-[(3-clorofenil)tio]propionico **34**. Resa 92%; P.f.: 72-74 °C; (P.f.: 77-78 °C)*<sup>[59]</sup>



### **7-cloro-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)-one 30b** <sup>[59]</sup>

A 5.66 g (26.2 mmoli) dell'acido 3-[(3-clorofenil)tio]propionico **27** vengono addizionati 45 ml di acido solforico conc. La miscela di reazione viene tenuta in agitazione magnetica a temperatura ambiente per circa 5 ore, controllandone l'andamento mediante T.L.C. miscela eluente: etere di petrolio 40-60 °C / AcOEt 8:2. Successivamente la miscela di reazione è versata in ghiaccio e il solido che precipita viene raccolto per filtrazione. Il composto desiderato **28** viene purificato mediante cristallizzazione da etere di petrolio 40-60 °C.

*7-Cloro-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)-one 32*. Resa 71%; P.f.: 62-64°C; (P.f. :64-65.5 °C)<sup>[59]</sup>

### **Acido 3-[(3-metossifenil)tio]propionico 33** <sup>[59]</sup>

1.76 ml (14,0 mmoli) di 3-metossitiofenolo vengono solubilizzati in 12 ml di una soluzione di NaOH 10%. 2.716 g (18,0 mmoli) di acido 3-bromopropionico vengono solubilizzati in una soluzione di 1.508 g (18 mmoli) di NaHCO<sub>3</sub> in 14 ml di H<sub>2</sub>O. Le due soluzioni vengono riunite e la miscela così ottenuta è lasciata in agitazione magnetica a temperatura ambiente per 12 ore e quindi a riflusso per 3 ore. Si ottiene una soluzione che viene acidificata a 0°C con HCl conc. fino a pH=4. Il solido bianco che precipita viene raccolto per filtrazione ottenendo 2.437 g di prodotto **33**.

Acido 3-[(3-metossifenil)tio]propionico **33** Resa 82 %. P.f. 56-58°C ; ( P.f : 58-60°C [ ] )

### **7-metossi-2,3-diidro-4H-1-benzotipiran-4-one 31c** <sup>[59]</sup>

6,87g (0,032 mmoli) del composto **35** vengono addizionati con 130ml di acido metansolfonico (MSA). La miscela di reazione viene riscaldata sotto continua agitazione magnetica a 75°C per 2 ore . Dopo raffreddamento, la soluzione ottenuta è versata in ghiaccio ed estratta con AcOEt . La fase organica è lavata prima con una soluzione di NaOH 10 % e poi con H<sub>2</sub>O; infine seccata su MgSO<sub>4</sub>. Dopo filtrazione il solvente è eliminato a pressione ridotta, ed il residuo purificato tramite cromatografia flash su colonna di gel di silice, utilizzando come miscela eluente: Esano/AcOEt 7:3

*7-Metossi-2,3-diidro-4H-1-benzotipiran-4-one* **31c** Resa %. P.f. 54-55°C ( P.f. 55-56 °C [ ] )

**3-dimetilamminometilen-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one 34a-c** <sup>[61-62]</sup>

2.28 mL (17,0 mmoli) di dimetilformammide dimetilacetale (DMF-DMA) vengono addizionati ad una soluzione dei derivati benzotipiranoici **31a-c** (7.0 mmol) in 10 mL di toluene. La miscela risultante viene fatta rifluire per 16-36 ore controllando l'andamento della reazione mediante T.L.C : AcOEt/Esano (in diversi rapporti). Dopo raffreddamento si ottiene una soluzione che viene portata a secco a pressione ridotta. Il residuo oleoso ottenuto viene grattato con Et<sub>2</sub>O in bagno di ghiaccio. Si forma un precipitato che viene filtrato, ottenendo i prodotti desiderati **34a-c**.

*3-dimetilamminometilen-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one* **34a** Resa 79% ; P.f. : 110-112 °C ;( P.f. :112-113 °C <sup>[62]</sup>)

*3-dimetilamminometilen-7-cloro-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one* **34b** Resa 90% ; P.f. : 105-110°C

*3-dimetilamminometilen-7-metossi-2,3-diidrobenzo[3',2':5,6]tiopiran-4(4H)-one* **34c** Resa 92% ; P.f. : 113-115°C; (P.f.: 115-120 °C <sup>[61]</sup> ).

**N-(p-solfonammido)benzilguanidina 35**

**Tentativo A** <sup>[63]</sup>

Ad 1,00g (54 mmoli) di 4-ammino-metil-benzensolfonammide cloridrato vengono addizionati 2,14 ml di cianammide (soluzione 50% in H<sub>2</sub>O). La miscela risultante è scaldata a riflusso per 3 ore. Dopo raffreddamento vi viene addizionata una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub>; e la soluzione risultante viene messa in freezer tutta la notte. Dopo scongelamento si ottiene una soluzione che viene portata a secco ed il residuo ottenuto viene purificato mediante cristallizzazione da etanolo. Dall'analisi dell'NMR risulta che si è formata una piccolissima percentuale di **35**.

**Tentativo B** <sup>[60]</sup>

0,300g (1 mmole) di 4-amminometilbenzensolfonammide vengono addizionati a 0,180g (0,9 mmoli) di 2-Metil-2-Pseudotiourea (sciolta nella minima quantità di acqua) in bagno di ghiaccio. La miscela è lasciata a temperatura ambiente per 2-3 ore e poi scaldata a riflusso

per 24 ore. Dopo raffreddamento il solvente viene eliminato a pressione ridotta ed il residuo cristallizzato da etanolo. Si ottengono i prodotti di partenza non reagiti.

#### **Procedura C:**

Ad una soluzione di 4-amminometilbenzensolfonammide 0,300g (1,3 mmoli) in 3ml di  $\text{NH}_4\text{OH}$  viene aggiunta la Metilpseudotiourea emisolfato 0,187g (1,3 mmoli) e la miscela risultante è scaldata a 70°C per 24 ore. Il solvente è evaporato a pressione ridotta. Dall'analisi dello spettro NMR risultano prodotti non desiderati.

#### **Procedura generale per la sintesi delle 2-ammino-5H-benzotiopirano[4,3-d]pirimidine**

##### **36a-c** <sup>[64-65]</sup>

0,160g (1,70mmoli) di guanidina cloridrato sono stati aggiunti, a temperatura ambiente, in atmosfera di azoto, ad una soluzione, in agitazione, di etossido di sodio (0,059 g, 2,55 mmoli di sodio in 8 ml di etanolo anidro), ed è stata fatta reagire a temperatura ambiente per 15 minuti, sotto costante agitazione. Quindi è stato aggiunto l'opportuno dimetilamminometilen derivato **34a-c** (0,85 mmoli) e la miscela di reazione è stata fatta refluire per 6h. Dopo raffreddamento, la sospensione ottenuta è stata portata a secco a pressione ridotta ed il residuo è stato lavato con acqua e filtrato a dare l'opportuna pirimidina **36a-c** grezza, la quale è stata purificata mediante cristallizzazione da etanolo.

**36a** p.f.: 166-169°C (167-168°C lit.)<sup>[64]</sup>

**36c** p.f. : 172-175°C (172-175°C lit.)<sup>[65]</sup>

**36b**: 75% di resa. P. f. 180-182°C; <sup>1</sup>H-NMR (dimetilsolfossido  $d_6$ ):  $\delta$  3.95 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{S}$ ); 6.71 (s, 2H,  $\text{NH}_2$  scamb) 7.35-7.41 (dd, 1H, 9-ArH  $J_{9-10} = 8.2\text{Hz}$   $J_{9-7} = 2.2\text{Hz}$ ); 7.51 (d, 1H, 7-ArH  $J_{7-9} = 2.0\text{Hz}$ ); 8.17 (d, 1H, 10-H  $J_{10-9} = 8.0\text{Hz}$ ); 8.24 (s, 1H, 4-ArH)

Anal. Calc. per  $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{S}$ : C, 52.90; H, 3.21; N, 16.83; Trov. C, 52.75; H, 3.24; N, 16.85

#### **1H-tiocroman-pirimidin-2-one 37**

##### **Procedura A:** <sup>[66]</sup>

1,00 g (4,7 mmoli) di **36a** vengono solubilizzati in 36 ml di HCl 50% V/V (preparato mescolando uguali volumi di HCl concentrato e  $\text{H}_2\text{O}$ ). La miscela risultante è scaldata a

riflusso per 72 ore. Dopo raffreddamento il solvente è evaporato a pressione ridotta, Ottenendo un solido giallo-arancio, sufficientemente puro, per essere utilizzato senza ulteriori purificazioni per lo step successivo.

*Resa: quantitative p.f. = 205-210°C <sup>1</sup>H-NMR (dimetilsolfossido d<sub>6</sub>): δ 3.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S); 7.18 (s, 1H, NH scamb) 7.34-7.38 (dt, 1H, ArH); 7.43-7.49 (m, 2H, ArH); 8.16 (s, 1H, ArH); 8.20 (d, 1H, ArH)*

#### **Procedura B:** <sup>[69]</sup>

0,936g (4 mmoli) di prodotto **39** vengono solubilizzati in 5ml di EtOH assoluto, si aggiungono poi 0,513g (8 mmoli) di Urea. La miscela risultante è scaldata a riflusso per 24 ore. Dopo raffreddamento il solvente è evaporato a pressione ridotta ottenendo così **37** grezzo che viene purificato tramite cromatografia flash su colonna di silice h=15 cm; diametro= 5 cm; eluente = Diclorometano/Metanolo 98:2).

*1H-tiocroman-pirimidin-2-one **37** Resa 40 % p.f. = 205-210°C*

*<sup>1</sup>H-NMR (dimetilsolfossido d<sub>6</sub>): δ 3.93 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S); 7.18 (s, 1H, NH scamb) 7.34-7.38 (dt, 1H, ArH); 7.43-7.49 (m, 2H, ArH); 8.16 (s, 1H, ArH); 8.20 (d, 1H, ArH)*

#### **2-cloro-2,5-diidro-1H-tiocroman[4,3-d]pirimidina **38**** <sup>[67]</sup>

Il composto **37** viene aggiunto a 9,5 ml di una soluzione di POCl<sub>3</sub>, la soluzione risultante viene scaldata a 90°C per 2 ore. Si evidenzia la formazione di un precipitato che viene filtrato sotto vuoto e seccato su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Il prodotto viene purificato mediante cromatografia flash (h = 15 cm ; diametro = 5 cm ; eluente= Etere di Petrolio/AcOEt 8:5 ).

*2-cloro-2,5-diidro-1H-tiochromen[4,3-d]pirimidina **38** Resa 44,7 % p.f. = 150°C-153°C*

*<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.96 (s, 2H, CH<sub>2</sub>S); 7.34-7.38 (m, 1H, ArH); 7.40-7.43 (m, 2H, ArH); 8.43(d, 1H, ArH); 8.48 (s, 1H, ArH)*

#### **4-(((2,5-diidro-1H-tiocroman[4,3-d]pirimidin-2-il)amino)metil)benzenesulfonamide **30a****

##### **Tentativo A** <sup>[70]</sup>

A 0,150g (0,64 mmoli) del composto **38** solubilizzati in 7 ml di Diossano, vengono addizionati 0,33 ml di DIPEA (19,2 mmoli) ed infine 0,143g (0,64 mmoli) di 4-amminometilbenzensolfonammide. La miscela risultante è scaldata a 90°C per 24 ore. Dopo raffreddamento si evapora il solvente a pressione ridotta, e al residuo è aggiunta H<sub>2</sub>O e la soluzione acquosa è estratta con AcOEt. La fase organica è lavata prima con H<sub>2</sub>O e successivamente con una soluzione acquosa satura di NaCl, seccata su MgSO<sub>4</sub>, filtrata ed il solvente è evaporato a pressione ridotta. Dall'analisi NMR del prodotto ottenuto è stato verificato che si tratta dei prodotti di partenza non reagiti.

**Tentativo B:** <sup>[71]</sup>

A 0,150 g (0,7 moli) del composto **38** sono solubilizzati in 4 ml di N-MetilPirrolidone, addizionati di 0,2 ml di DIPEA ed infine 0,187 g (0,8mmoli) di 4-Amminometilbenzensolfonammide. La miscela risultante è scaldata a 120°C per 24 ore e La soluzione ottenuta è raffreddata a temperatura ambiente ed addizionata di H<sub>2</sub>O (2ml) ed CH<sub>3</sub>COOH (0,05 ml). Si ha la formazione di un solido che è filtrato sotto vuoto, lavato con H<sub>2</sub>O e di nuovo filtrato. Dopo averlo seccato su P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, viene disciolto, sotto continua agitazione, in una miscela di Acetonitrile/etere (rapporto 1:6) fino alla precipitazione di una polvere fine che viene filtrata sottovuoto. Dall'analisi NMR, possiamo concludere che non è stato ottenuto il prodotto desiderato.

**Tentativo C:** <sup>[73]</sup>

Una soluzione di **36a** 0,200g (0, 93 mmoli) in THF anidro viene mantenuta in bagno di ghiaccio a 0°C, vi si aggiungono 0,037g (0, 93 mmoli) di NaH e la miscela risultante è lasciata in agitazione per 15 minuti. Si aggiungono poi 0,058g (0, 23 mmoli) di composto 40. La miscela risultante è lasciata a temperatura ambiente per 24 ore. Il solvente è evaporato a pressione ridotta ed estratto con una miscela Diclorometano/H<sub>2</sub>O. La fase organica è lavata con H<sub>2</sub>O, con una soluzione satura di NaHCO<sub>3</sub> ed infine con una soluzione satura di NaCl. Il solvente è evaporato a pressione ridotta. Dall'analisi NMR risultano i composti di partenza non reagiti.

**3-Idrossietilen-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)-one 39a****3-Idrossimetilen-7-cloro-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)-one 39b****3-Idrossimetilen-7-metossi-2,3-diidro-1-benzotipiran-4(4H)-one 39c**

Una soluzione costituita da 0.83 ml (10.30 mmoli) di etilformiato in 4 ml di toluene anidro, viene aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di metossido di sodio preparato di fresco (10.30 mmoli) in 4 ml dello stesso solvente. La miscela, raffreddata in ghiaccio, viene addizionata, in corrente azoto anidro, di una soluzione di prodotto **31a-c** (5.15 mmoli) in 8 ml di toluene anidro. La soluzione ottenuta, viene lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 24 ore, controllando l'andamento della reazione mediante t.l.c. (benzina 60-80 °C / AcOEt = 7 : 3). Si ottiene una sospensione gialla che viene filtrata. Il solido raccolto viene solubilizzato in poca acqua e trattato con acido cloridrico 18% fino a pH 3 per dare i prodotti desiderati **31a-c**.

**39a:** olio giallo resa 80% <sup>[67]</sup>

**39b:** resa: 91 %.

*P. f.:* 102-104 °C <sup>[68]</sup>

**39c:** resa 49%

*P. f.* 90-92 °C <sup>[68]</sup>

**4-(bromometil)benzenesulfonamide 40 <sup>[72]</sup>**

Ad una soluzione di 4-(bromometil)benzenesulfonilcloruro 0,300g (0,0011moli) in 4,5 ml di THF, in bagno di ghiaccio, vengono addizionati 0,29 ml di NH<sub>4</sub>OH. Si lascia reagire a 0°C per 1 ora e la soluzione ottenuta è estratta con H<sub>2</sub>O ed AcOEt. La fase organica è seccata su MgSO<sub>4</sub>, filtrata ed il solvente è evaporato a pressione ridotta, ottenendo così 0,217g di prodotto desiderato **40** come polvere bianca.

*Resa 66% P.f. 190-193°C (P.f. = 197 °C lit.)*<sup>[72]</sup>

# *Bibliografia*

- [1] Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Casini, A. Carbonic anhydrase inhibitors. *Med. Res. Rev.* , **2003** , 23, 146-189.
- [2] Hilvo, M.; Tolvanen, M.; Clark, A.; Shen, B.; Shah, G. N.; Waheed, A.; Halmi, P.; Hanninen, M.; Hamalainen, J. M.; Vihinen, M.; Sly, W. S.; Parkkila, S. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochem. J.*, **2005** , 392 , 83-92.
- [3] Guerri, A.; Briganti, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T.; Mangani, S. Mechanism of cyanamide hydration catalyzed by carbonic anhydrase II suggested by cryogenic X-ray diffraction. *Biochemistry* , **2000** , 39, 12391-12397.
- [4] Whittington, D. A.; Grubb, J. H.; Waheed, A.; Shah, G. N.; Sly, W. S.; Christianson, D. W. Expression, assay, and structure of the extracellular domain of murine carbonic anhydrase XIV: implications for selective inhibition of membrane-associated isozymes. *J. Biol. Chem.* , **2004** , 279, 7223-7228.
- [5] Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases as Drug Targets, An Overview Current Topics in *Medicinal Chemistry* , **2007** , 7, 825-833.
- [6] Supuran C. T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat. Rev. Drug Disc.* , **2008** , 7, 168-181.



- [7] Khalifah, R. J. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.*, **1971**, 246, 2561–2573.
- [8] (a) Clare, B. W.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators. Part 3. Structure-activity correlations for a series of isozyme II activators. *J. Pharm. Sci.* **1994**, 83, 768-773; (b) Temperini, C.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran C.T., Carbonic anhydrase activators. Activation of isoforms I, II, IV, VA, VII, and XIV with L- and D-phenylalanine and crystallographic analysis of their adducts with isozyme II: stereospecific recognition within the active site of an enzyme and its consequences for the drug design. *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 3019-3027.
- [9] (a) Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine. *Biochemistry*, **1997**, 36, 10384-10392; (b) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Puccetti, L.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: X-ray crystal structure of the adduct of human isozyme II with L-histidine as a platform for the design of stronger activators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, 15, 5136-5141; (c) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators. Activation of isozymes I, II, IV, VA, VII, and XIV with L- and D-histidine and crystallographic analysis of their adducts with isoform II: engineering proton-transfer processes within the active site of an enzyme. *Chemistry*, **2006**, 12, 7057-7066; (d) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran C.T., Carbonic anhydrase activators: L-Adrenaline plugs

the active site entrance of isozyme II, activating better isoforms I, IV, VA, VII, and XIV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , **2007** , 17, 628-635; (e) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase activators: kinetic and X-ray crystallographic study for the interaction of D- and L-tryptophan with the mammalian isoforms I-XIV. *Bioorg. Med. Chem.* , **2008** , 16, 8373-8378.

[10] Briganti, F.; Mangani, S.; Orioli, P.; Scozzafava, A.; Vernaglione, G.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with istamine. *Biochemistry*, **1997** , 36, 10384-10392.

[11] Stams, T.; Christianson, D. W. X-ray crystallographic studies of mammalian carbonic anhydrase isozymes. *In The Carbonic Anhydrases—New Horizons* ; Chegwiddden, W. R., Edwards, Y., Carter, N., Eds.; Birkhäuser Verlag, Basel, **2000** ; 159–174.

[12] Supuran, C. T., Scozzafava, A., Conway, J., Eds.; *Carbonic Anhydrase . Its Inhibitors and Activators*; CRC Press: Boca Raton (FL), USA, **2004** ; 1–363.

[13] (a) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases as Drug Targets—General Presentation. In *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications* ; Supuran, C. T., Winum, J. Y., Eds.; Wiley: Hoboken (NJ), **2009** ; 15–38; (b) Winum, J. Y.; Rami, M.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Supuran C., Carbonic anhydrase IX: a new druggable target for the design of antitumor agents. *Med. Res.*

*Rev.*, **2008**, 28, 445-463; (c) Domsic, J. F.; Avvaru, B. S.; Kim, C. U.; Gruner, S. M.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; McKenna, R., Entrapment of carbon dioxide in the active site of carbonic anhydrase II. *J. Biol. Chem.*, **2008**, 283, 30766-30771.

[14] (a) Supuran C. T., Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 641-648; (b) Supuran, C. T.; Di Fiore, A.; De Simone G., Carbonic anhydrase inhibitors as emerging drugs for the treatment of obesity. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **2008**, 13, 383-392; (c) De Simone, G.; Di Fiore, A.; Supuran C. T., Are carbonic anydrase inhibitors suitable for obtaining antiobesity drugs?. *Curr. Pharm. Des.* **2008**, 14, 655–660; (d) Mincione, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Antiglaucoma Carbonic Anhydrase Inhibitors as Ophthalmologic Drugs. In *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*; Supuran, C. T., Winum, J. Y., Eds.; Wiley: Hoboken (NJ), **2009**; 139–154; (e) Krungkrai, J.; Supuran C. T., The alpha-carbonic anhydrase from the malaria parasite and its inhibition. *Curr. Pharm. Des.*, **2008**, 14, 631-640.

[15] Mincione, F. et al. The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2007**, 7, 849–854.

- [16] Sugrue, M. F. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors. *Prog. Retin. Eye Res.*, 2000, 19, 87–112.
- effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring? *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2641–2650.
- [17] Scozzafava, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 74. Synthesis of water-soluble, topically effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring? *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2641-2650.
- [18] Temperini, C.; Innocenti, A.; Mastrolorenzo, A.; Scozzafava, A.; Supuran C. T., Carbonic anhydrase inhibitors. Interaction of the antiepileptic drug sulthiame with twelve mammalian isoforms: kinetic and X-ray crystallographic studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, 17, 4866-4872.
- [19] Steele, R. M.; Batugo, [21] Scozzafava, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Part 74. Synthesis of water-soluble, topically M. R.; Benedini, F.; Biondi, S.; Borghi, V.; Carzaniga, L.; Impagnietello, F.; Miglietta, D.; Chong, W. K. M.; Rajapakse, R.; Cecchi, A.; Temperini, C.; Supuran C. T., Nitric oxide-donating carbonic anhydrase inhibitors for the treatment of open-angle glaucoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6565-6570.

[20] Fabrizio Carta Sameh M. Osman , Daniela Vullo , Antonella Gullotto , Jean-Yves Winum ,Zeid AlOthman , Emanuela Masini, and Claudiu T. Supuran Poly(amidoamine) Dendrimers with Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity and Antiglaucoma Action

*J. Med. Chem.*, **2015**, 58 (9), pp 4039–4045

[21] Gao, B. B. et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature Med.* , **2007** , 13, 181–188.

[22] Maren, T. H. The development of topical carbonic anhydrase inhibitors. *J. Glaucoma*, **1995** , 4, 49–62.

[23] Innocenti, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the membrane-bound human and bovine isozymes IV with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , **2005** , 15, 1149–1154.

[24] Liao, S. Y. et al. Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CA XII) in glaucoma. *J. Med. Genet.*, **2003** , 40, 257–261.

[25] Thiry, A.; Supuran, C. T.; Masereel, B.; Dogné, J. M., Recent developments of carbonic anidrase inhibitors as potential anticancer drugs. *J. Med. Chem.* , **2008** , 51, 3051-3056.

[26] Brahimi-Horn, M. C. & Pouyssegur, J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Let.*, **2007** , 581, 3582–3591.

[27] Thiry, A. et al . Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends Pharmacol. Sci .*, **2006** , 27, 566–573.

[28] Nishimori, I. et al . Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *J. Med. Chem .*, **2007** , 50, 381–388.

[29] Vullo, D., et al . Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003** , 13, 1005–1009.

[30] Teicher, B. A.; Liu, S. D.; Liu, J. T.; Holden, S. A.; Herman, T. S. A carbonic anhydrase inhibitor as a potential modulator of cancer therapies. *Anticancer Res.* ,**1993** , 13, 1549–1556.

[31] Abbate, F. et al . Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorg. Med. Chem. Lett .*, **2004** , 14, 217–223.

- [32] Wilkinson, B. L.; Bornaghi, L. F.; Houston, T. A.; Innocenti, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S. A., A novel class of carbonic anhydrase inhibitors: glycoconjugate benzene sulfonamides prepared by “clicktailing”. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6539–6548.
- [33] De Simone, G.; Vitale, R. M.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Montero, J. L.; Winum, J. Y.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors: hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5544–5551.
- [34] Köhler, K. et al. Saccharin inhibits carbonic anhydrases: possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2007**, 46, 7697–7699.
- [35]. Ahlskog, J. K.; Schliemann, C.; Mårlind, J.; Qureshi, U.; Ammar, A.; Pedley, R. B.; Neri, D. Br., Human monoclonal antibodies targeting carbonic anhydrase IX for the molecular imaging of hypoxic regions in solid tumours. *J. Cancer*, **2009**, 101, 645-657.
- [36] Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity. *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2003**, 13, 1545–1550.
- [37] Casini, A.; Antel, J.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; David, S.; Waldeck, H.; Schäfer, S.; Supuran, C. T., Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, 13, 841-845.

[38] Picard, F. et al. Topiramate reduces energy and fat gains in lean ( Fa/? ) and obese (fa/fa ) Zucker rats. *Obesity Res.*, **2000** , 8, 656–663.

[39] Gadde, K. M. et al . Zonisamide for weight loss in obese adults: a randomized controlled trial. *JAMA* , **2003** , 289, 1820–1825.

[40] Smith, K. S.; Jakubzick, C.; Whittam, T. S.; Ferry, J. G. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999** , 96, 15184-15189.

[41] Zimmerman, S. A.; Ferry, J. G.; Supuran, C. T. Inhibition of the Archaeal  $\beta$ -Class (Cab) and  $\gamma$ -Class (Cam) Carbonic Anhydrases. *Curr. Top. Chem.* **2007** , 7, 901-908.

[42] Tructure and metal Exchange in the cadmium carbonic anhydrase of marine diatoms. *Nature* **2008** , 452, 56-61.

[43] Alterio, V.; Langella, E.; Viparelli, F.; Vullo, D.; Ascione, G.; Dathan, N. A.; Morel, F. M. M.; Supuran, C. T.; De Simone, G.; Monti, S. M. structural and inhibition insights into carbonic anhydrase CdCA 1 from the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Biochimie* **2012** , 94, 1232-1241.



[44] Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple Binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms. *Chem. Rev.* **2012** , 112, 4421-4468.

[45] Supuran, C. T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Rev. Drug Discovery* **2008** , 7, 168-181.

[46] Ahlskog, J. K.; Schliemann, C.; Marlind, J.; Qureshi, U.; Ammar, A.; Pedley, R. B.; Neri, D. In vivo targeting of tumor-associated carbonic anhydrases using acetazolamide derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009** , 19, 4851-4856.

[47] Neri, D.; Supuran, C. T. Interfering with pH regulation in tumours as a therapeutic strategy. *Nature Rev. Drug Discovery* **2011** , 10, 767-777.

[48] Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010** , 20, 3467-3474.

[49] Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Pastorek, J.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004** , 19, 199-229.

[50] Supuran, C. T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012** .

[51] Cottier, F.; Raymond, M.; Kurzai, O.; bolsa, M.; Leewattanapasuk, W.; Jimenez-Lopez, C.; Lorenz, M. C.; Sanglard, D.; Vachova, L.; Pavelka, N.; Palkova, Z.; Muhlschlegel, F. A. The bZIP transcription factor Rcalp is a central regulator of a novel CO<sub>2</sub> sensing pathway in yeast. *PLOS Pathogens* **2012** , 8, e10002485.

[52] Mogensen, E. G.; Janbon, G.; Chaloupka, J.; Steegborn, C.; Fu, M. S.; Moyrand, F.; Klengel, T.; Pearson, D. S.; Geeves, M. A.; Buck, J.; Levin, L. R.; Muhlschlegel, F. A. Fungal adenylyl cyclase integrates CO<sub>2</sub> sensing cAMP signaling and virulence. *Curr. Biol.* **2005** , 15, 2021-2026.

[53] Supuran, C. T. Bacterial carbonic anhydrases as drug targets: towards novel antibiotics? *Front. Pharmacol.* **2011** , 2, 34.

[54] Marini, A. M.; Maresca, A.; Aggarwal, M.; Orlandini, E.; Nencetti, S.; Da Settimo, F.; Salerno, S.; Simorini, F.; La Motta, C.; Taliani, S.; Nuti, E.; Scozzafava, A.; McKenna, R.; Rossello, A.; Supuran C.T., Tricyclic Sulfonamides Incorporate Benzothiopyrano[4,3-c]pyrazole and Pyridothiopyrano[4,3-c]pyrazole Effectively Inhibit  $\alpha$ - and  $\beta$ -Carbonic Anhydrase: X-ray Crystallography and Solution Investigations on 15 Isoforms. *J. Med. Chem.* **2012** , 55, 9619-9629.

[55] Weber, A.; Casini, A.; Heine, A.; Kuhn, D.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Klebe, G. Unexpected nano molar inhibition of carbonic anhydrase by COX-2 selective Celecoxib: New pharmacological opportunities due to related binding site recognition. *J. Med. Chem.* **2004** , 47, 550-557.

[56] Di Fiore, A.; Pedone, C.; D'Ambrosio, K.; Scozzafava, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrases inhibitors: Valdecoxib binds to a different active site region of the human isoform II as compared to the structurally related, cyclooxygenase II "selective" inhibitor celecoxib. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006** , 16, 437-422.

[57] Dognè, J. M.; Thiry, A.; Pratico, D.; Masereel, B.; Supuran, C. T. Dual carbonic anhydrase-cyclooxygenase-2 inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007** , 7, 885-891.

[58] Nishimori, I.; Minakuchi, T.; Onishi, S.; Vullo, D.; Cecchi, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. *Bioorg. Med. Chem.* **2007** , 15, 7229-7236.

[58] Degani, I.; Fochi, R.; Spunta, G. Heteroaromatic cations. VI. Synthesis Of Thiachromylium Perchlorate Derivatives, *Bollettino Scientifico Della Facoltà Di Chimica Industriale Di Bologna*, 1966 , 24, 75-91.

[59] Bruno, O.; Schenone, S. ; Ranise, A. Antiinflammatory agents: new series of N-substituted amino acids with complex pyrimidine structures endowed with antiphlogistic activity. *Il Farmaco* ,**1999**, 54, 95

.

[60] Crowter, A.F.; Curd, F.H.S.; Richardson, D.N., Rose, F.L.; J. Chem. Soc., **1948**, 1636-1645

[61] Chusae-Lee et al. *Huaxue Xubao* , **1956**, 22, 371-378

[62] Marini, Anna Maria; Da Settimo, Federico; Salerno, Silvia; La Motta, Concettina; Simonini Francesca; Taliani, Sabrina; Bertini, Daniele; Già Ornella; Della Via, Lisa. Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of new substituted benzo[3',2':5,6]thiopyrano[4,3-d]pyrimidines. *Journal of heterocyclic chemistry* **2008**,45(3),745-749

[63] PCT Int. Appl. 2003051886 (**2003**)

[64] Bruno, Olga; Schenone, Silvia; Ranise, Angelo; Bondavalli, Francesco; Barocelli, Elisabetta; Ballabeni, Vigilio; Chiavarini, Milena; Bertoni, Simona; Tognolini, Massimiliano; Impicciatore, Mariannina. New polycyclic pyrimidine derivatives with antiplatelet *in vitro* activity: synthesis and pharmacological screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2001, 9, 629-636

[65] Marini, Anna Maria; Da Settimo, Federico; Salerno, Silvia; La Motta, Concettina; Simorini, Francesca; Taliani, Sabrina; Bertini, Daniele; Già, Ornella; Dalla Via, Lisa. Synthesis and *in vitro* antiproliferative activity of new substituted benzo[3',2':5,6]thiopyrano[4,3-d]pyrimidines, *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2008**, 45, 745-749

[66] PCT int. Appl. 2008083356 (**2008**)

[67] TOSIO AIORIWAE Syntheses of 3-Cyano-3-methyl-4-thiochromanone and 3-Carbomethoxy-3-methyl-4-thiochromanone Journal of Medicinal Chemistry (**1966**), 9(1), 163-4

[68] Dalla Via, L.; Marini, A. M.; Salerno, S.; La Motta, C.; Condello, M.; Arancia, G.; Agostinelli, E.; Toninello, A. Synthesis and biological activity of 1,4-dihydrobenzothiopyrano[4,3-c]pyrazole derivatives, novel pro-apoptotic mitochondrial targeted agents. Bioorg. Med. Chem. 17 (**2009**) 326–336

[69] V.spanò et al. European journal of medicinal chemistry 74 (**2014**)

[70] WO 2008077651 A1 (**2008**)

[71] WO 2010002998 A1 (**2010**)

[72] Pct. iNt appl2010091382 (**2010**)

[73] G. Chiriano et al. European Journal of chemistry **2012**

# *Ringraziamenti*

Arrivato alla fine di questo lavoro ritengo opportuno ringraziare le persone che mi hanno aiutato nella sua realizzazione.

Ringrazio innanzitutto la professoressa Silvia Salerno, la professoressa Sabrina Taliani per avermi permesso di svolgere la tesi di laurea presso il loro laboratorio di ricerca.

Ringrazio la dottoressa Elisabetta Barressi la quale, anche se per il poco tempo in cui abbiamo lavorato insieme, si è dimostrata paziente, comprensiva, aiutandomi e sopportandomi durante il mio lavoro in laboratorio. Soprattutto la ringrazio per aver sempre avuto fiducia nella sintesi dei composti.

Ringrazio il Dottor Marco Robello che in questi mesi mi ha sempre dato consigli utili, nonostante non fosse suo compito farlo.

Ringrazio la mia famiglia per avermi sempre supportato nelle mie scelte e soprattutto per avermi potuto permettere di conseguire questo titolo.

Ringrazio mio padre e mia madre per avere sempre creduto in me e non avermi mai abbandonato nei momenti di difficoltà; ringrazio anche i miei nonni, Giuliano e Fernanda, per avermi sfamato, sopportato, coccolato e, tra l'altro, ospitato a casa loro in questi cinque anni.

Ringrazio tutte le persone che ho conosciuto durante questi anni, poiché ho incontrato degli ottimi amici e spero che questi rapporti non vengano persi dopo la fine dell'Università.

Infine, ringrazio l'Università di Pisa per avermi fatto conoscere la mia ragazza Martina Mugnaini, con la quale, soprattutto in questi ultimi tre anni, ho condiviso tutto, dallo studio, alle amicizie, ai viaggi. La ringrazio inoltre, infinitamente, per avermi aiutato nella stesura della Tesi: senza di lei il documento word, la presentazione power point e soprattutto la scrittura in un italiano corretto, non sarebbero stati presenti.

Non può mancare il ringraziamento al mio gatto Pugacioff che mi ha sempre fatto compagnia durante lo studio, anche se si sdraiava sui fogli coprendo quello che dovevo leggere.

Grazie a tutti.

Iacopo Malasoma

